
ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО РОССИИ
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА РОССИИ
КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ



СБОРНИК ТРУДОВ

IV МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ

*Постгеномные методы анализа в биологии,
лабораторной и клинической медицине*

КАЗАНЬ, РОССИЯ

29 октября – 1 ноября 2014



Казань
2014

Спонсоры и участники выставки



ХИМЭКСПЕРТ





CONTENTS

K – Plenary lectures.....	6
S01 – Genomics and metagenomics.....	10
S02 – Methods of analysis of the transcriptional activity of coding and noncoding parts of the genome.....	44
S03 – Proteomics, peptidomics and metabolomics.....	62
S04 – Bioinformatics. Information technology in processing and interpretation of genome data.....	96
S05 – Nanotechnologies in medical and biological research.....	124
S06 – Biomarkers, genes and omics in studies on pathogenesis of socially significant human diseases. Molecular epidemiology.....	175
S07 – Biomarkers, genes and omics in studies of pathogenesis of socially significant human diseases. Molecular epidemiology.....	193
S08 – Personalized medicine.....	247
S09 – Postgenomic technologies in drug design and discovery.....	265
S10 – Sports medicine.....	287

СОДЕРЖАНИЕ

K – Пленарные лекции.....	6
S01 – Геномика и метагеномика.....	10
S02 – Методы анализа транскрипционной активности кодирующей и некодирующей части генома.....	44
S03 – Протеомика, пептидомика и метаболомика.....	62
S04 – Биоинформатика. Информационные технологии в обработке и интерпретации омных данных.....	96
S05 – Клеточные технологии и регенеративная медицина.....	124
S06 – Нанотехнологии в медицинских и биологических исследованиях.....	175
S07 – Биомаркеры, гены и омиксы в исследованиях патогенеза социально значимых заболеваниях человека. Молекулярная эпидемиология.....	193
S08 – Персонализированная медицина.....	247
S09 – Постгеномные технологии в поиске и дизайне лекарств.....	265
S10 – Спортивная медицина.....	287

K01**WHEN GENOMICS MEETS OTHER OMICS: THE POTENTIAL OF MULTI-OMICS FOR DISENTANGLING HUMAN DISEASES****Yurii Aulchenko***Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia; University of Edinburgh, UK*

A decade ago, very little was known about genes influencing risk of common human disorders. During last decade, enormous progress has been achieved in the field of human complex disease genetics, and thousands of loci were identified for human diseases and health-related traits. These advances were made possible by development of technology of SNP arrays and systematic and wide use of genome-wide association scanning (GWAS) method. While application of GWAS led to accumulation of large body of knowledge, this approach in its classical form has certain limitations for understanding biology of complex, organism-level traits. Namely, GWAS allows identification of trait-associated loci - genomic regions, which usually contain very large number of functional elements. The potential of GWAS to refine association to a specific functional element is limited because of ubiquitous presence of linkage disequilibrium in studied populations. To fully exploit the potential of GWAS discoveries, new approaches are needed which would allow answering the question which specific biological function is affected by the locus, and how this change translates into disease. The classical way to link a locus to the biological function would imply targeted functional study. However, new opportunities emerge with developments in omics technologies. Nowadays it became feasible to profile very large groups of individuals not only for their genomes, but also for epigenomes, transcriptomes, proteomes, glycomes, metabolomes. Large international projects, collecting such information from multiple tissues, are under the way. This plentitude of information opens up new opportunities for better understanding of fundamentals of genetics and biology in general and biology of common human diseases in particular. In this talk, I will make an overview of advances made possible by application of GWAS approach, highlight its limitations, and discuss potential solutions involving use of multi-omics approach.

K02

HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE DEFICIENCY AND FUNCTION OF BUTYRYLCHOLINESTERASE

Oksana Lockridge

University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

Genetic variants of human butyrylcholinesterase (BChE) were discovered about 70 years ago, when physicians noticed that certain people responded abnormally to the muscle relaxant succinylcholine. A standard dose of succinylcholine paralyzed most people for 3 minutes, but a few people were unable to breathe for 2 hours. The sensitivity to succinylcholine is an inherited trait. One person out of 2500 Caucasians is homozygous for the “atypical” variant. Molecular biology tools identified the mutation in atypical BChE as a single amino acid substitution that changed Aspartic acid 70 to Glycine. People with the atypical variant have a defective BChE enzyme that is unable to hydrolyze succinylcholine due to loss of binding affinity for positively charged compounds. A very rare phenotype has no BChE activity. One person out of 100,000 is homozygous for “silent” BChE. The absence of BChE activity in the silent variant is explained by a variety of mutations in the BChE gene.

People with silent BChE, who are completely deficient in BChE, are nevertheless healthy, fertile, and live to old age. This has led to the idea that BChE has no function. The purpose of this presentation is to demonstrate that BChE has several functions, and to propose that absence of BChE is compensated by other esterases.

Human butyrylcholinesterase (BChE, accession number P06276) is found in blood at a concentration of 4 mg per liter of plasma. BChE functions: 1) as a bioscavenger of toxic chemicals including organophosphorus pesticides and nerve agents. Plasma derived BChE is being developed as a therapeutic to protect humans from nerve agent toxicity. 2) BChE hydrolyzes esters including cocaine. The cocaine hydrolase activity of human BChE has been optimized by introduction of 5 mutations near the active site. A gene therapy strategy is being developed to use an engineered mutant of human BChE to help recovering cocaine addicts from relapsing into drug taking. 3) BChE hydrolyzes the ester bond in octanoyl ghrelin, an appetite-stimulating hormone, thus converting it to the inactive hormone desacyl ghrelin. Carboxylesterase also performs this function, thus explaining why BChE deficiency is not associated with obesity. 4) The BChE tetramer consists of 4 identical BChE subunits, each 574 amino acids in length. In addition the BChE tetramer contains a polyproline-rich peptide that noncovalently interacts with the four C-terminal alpha helices of 4 BChE subunits. Polyproline is required for assembly of BChE into tetramers. The unusual feature of the polyproline peptide is that it is not a single sequence but is a mixture of many different sequences, some of which have no match in the human gene database. BChE appears to scavenge polyproline peptides released from multiple proteins.

Mass spectrometry is used to identify these functions of BChE. Exposure to organophosphorus pesticides and nerve agents is detected as an adduct on the active site serine of BChE. Pepsin digestion of BChE immunopurified from human plasma yields the active site peptide FGES198AGAAS covalently modified on serine 198 by nerve agents or pesticides. A mass spectrometry assay convincingly demonstrates hydrolysis of octanoyl ghrelin to desacyl ghrelin. The presence of a family of polyproline peptides in the BChE tetramer is revealed by mass spectrometry of peptides released from pure human BChE tetramers.

People who are completely deficient in BChE are healthy. However, it is suspected that they are more susceptible to toxicity from pesticides, nerve agents, and cocaine. BChE deficient humans are not obese, suggesting that other enzymes compensate for the absence of BChE regarding ghrelin hydrolysis. BChE is assembled into tetramers through interaction with a polyproline peptide. A compensating enzyme for the function of scavenging polyproline peptides is acetylcholinesterase (AChE) because soluble, tetrameric AChE has polyproline peptides in its structure.

In conclusion, human BChE is a bioscavenger. It scavenges poisons as well as polyproline peptides. Other esterases compensate for lack of BChE activity in genetic variants of human BChE.

K03

SELENOPROTEINS IN HEALTH AND DISEASE. TOWARDS UNDERSTANDING THEIR PECULIAR MECHANISM OF BIOSYNTHESIS

Olga Kossinova^{1,2}, Alexey Malygin¹, Galina Karpova¹, Alain Krol²

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;* ²*Architecture and Reactivity of RNA – Institute of Molecular and Cellular Biology, CNRS – University of Strasbourg, France*

Selenoproteins harbor the selenium-containing amino acid selenocysteine (Sec) in the active site. These proteins fulfil as varied functions as defence against reactive oxygen species, sperm and thyroid hormone maturation, muscle biogenesis. Selenoprotein biosynthesis is not a standard mechanism because UGA, otherwise a stop codon for translation, encodes selenocysteine. Reading selenocysteine instead of stop at the UGA Sec codon is a complex event that requires a dedicated machinery with specialized RNAs and proteins, including the SECIS stem-loop in the 3'UTR of selenoprotein mRNAs and the SECIS binding protein SBP2. Mutations in these or other components lead to embryonic lethality or various muscular or mental pathologies, attesting the importance of selenoproteins in health and disease. At the mechanistic level, the central question is to understand how assembly of a selenoprotein mRNA-multicomponent complex occurs in an orderly and temporal fashion so that approaching ribosomes are cleared at the UGA Sec codon. As little was known regarding the issue, our goal was to understand where and when selenoprotein mRNAs and components of the machinery interact with the ribosome in the course of translation.

We used synthetic mini-selenoprotein mRNAs carrying photoactivatable groups in the SECIS motif for UV cross-linking to ribosomes; hydroxyl radical footprinting of SBP2-human ribosomes complexes; bi-functional reagents to cross-link SBP2 to purified human ribosomes. RNA-protein cross-links were revealed by gel electrophoresis.

We showed that SBP2 is bound to the SECIS at the pre-initiation step of translation; it then binds the ribosome at the pre-translocation step to bring the Sec-tRNA^{Sec} to the UGA Sec codon; subsequently, SBP2 returns to the SECIS after the transpeptidation step. We also identified the binding site of SBP2 on the human ribosome.

Altogether, our findings led for the first time to broaden our understanding about the unique mechanism of selenoprotein incorporation in mammals. Also, our study established that SBP2 makes direct contacts with a discrete region of the human 28S ribosomal RNA.

K04**ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ****В.В. Власов*****Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
Российская Федерация***

На основе олигонуклеотидов могут быть созданы терапевтические препараты, подавляющие экспрессию связанных с болезнью генов клетки, блокирующие функции заданных белков, инактивирующих геномы инфекционных агентов и вводящих специфичные мутации в заданные гены.

«Антисмысловые» олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК и рибозимы позволяют инактивировать РНК, содержащие целевые нуклеотидные последовательности, катализируя их разрушение. Антисмысловые олигонуклеотиды и интерферирующие РНК, подавляющие функции мРНК, микроРНК и вирусных РНК, широко применяются в биологических исследованиях и уже начато их внедрение в клиническую практику.

Аптамеры, подобно антителам, способны избирательно связываться с определенными белками и препятствовать их функционированию. На их основе могут быть получены препараты, блокирующие функции белков: ферментов, рецепторов и регуляторов активности генов. На основе двуцепочечных РНК и ДНК, взаимодействующих с определенными рецепторами, удастся получить препараты, обладающие иммуностимулирующим действием.

Основной проблемой на пути создания широкого спектра терапевтических нуклеиновых кислот является отсутствие эффективных методов введения их в клетки. В ближайшее время работы по созданию аналогов и конъюгатов нуклеиновых кислот и разработка векторов на основе синтетических органических соединений, наночастиц и мембранных носителей могут решить эту проблему.

S01-01

METAGENOMIC ANALYSIS OF EXTREMOPHILIC MICROBIAL COMMUNITIES

Vitaly V. Kadnikov¹, Alexey V. Beletsky¹, Andrey V. Mardanov¹, Olga V. Karnachuk², Nikolai V.

Ravin¹

¹Centre 'Bioengineering' RAS, Moscow, Russia

²Tomsk State University, Tomsk, Russia

The deep subsurface ecosystems are characterised by anaerobic conditions, extremely high pressure and high temperature. Our knowledge of the microorganisms inhabiting these ecosystems is still limited. We analysed the diversity and possible biogeochemical functions of microbial communities inhabiting underground thermal aquifers of Western Siberia (Tomsk region, Russia) by metagenomic analysis. We studied the microbial communities of the underground thermal waters springing out of a 2-3 km deep oil-exploration boreholes 3P (Parabel district, 46-51°C), and 1-R (Belyi Yardistrict, 40-45°C). Two approaches were used to characterize the microbial communities: identification of microorganisms based on pyrosequencing of 16S rRNA genes fragments, and sequencing of the total community DNA.

The borehole 3P was drilled into putatively Mesozoic sedimentary rocks of the Western Siberia basin about fifty years ago but no oil was found. The 16S rRNA analysis indicated the dominance of *Firmicutes* (~80% of bacteria), represented by sulfate-reducing bacteria of the genera *Desulfovibrula* (~53%) and *Desulfotomaculum* (~12%), as well as by organisms related to *Thermacetogenium* (~8%) and several uncultured lineages of *Firmicutes*. Methanogenicarchaea of the genus *Methanothermobacter* accounted for the minor part of the community. Sequencing of the whole metagenome allowed identification of genes and their functional and taxonomic assignment. Analysis of the taxonomic composition of the community, as well as a set of encoded genes, indicates that microbial community of 3P borehole is characterised by mostly chemolithoautotrophic metabolism based on oxidation of hydrogen coupled to sulfate reduction. Results of metagenomic analysis of 1-R site, located near the village BelyiYar, revealed quite different and more diverse microbial community, dominated by uncultured bacterial lineages affiliated to *Firmicutes*, *Deltaproteobacteria*, *Ignavibacteria*, *Chloroflexi* and *Nitrospira*, as well as lineages that could not be classified even at phylum level. The data on the composition and metabolic potential of this community will be presented. Overall the results of this study provide new information regarding previously uncharacterised thermal deep subsurface environment.

S01-02**ГЕНОМНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ЭНДЕМИЧНЫХ ДЛЯ РОССИИ
КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS***

Ильина Е.Н.1, Шитиков Е.А.1, Бесярых Ю.А.1, Ищенко Д.С.1, Вязовая А.А.2, Мокроусов И.В.2, М. В. Шульгина3, В. Ю. Журавлев3,

1 ФГБУН «НИИ Физико-Химической Медицины ФМБА», Москва, Россия

2 НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

3 Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург

Туберкулез, вызываемый *M. tuberculosis* (MTB), является одной из значимых проблем здравоохранения и социального развития России. Особую озабоченность вызывает возникновение и распространение штаммов, демонстрирующих высокую вирулентность и ассоциацию с лекарственной устойчивостью. Для России таким “успешным” генотипом является Beijing, в частности клональная группа B0/W148.

В работе представлен сравнительный анализ данных полногеномного секвенирования клинических штаммов MTB, относящихся к эндемичным для России генотипам. Включены как собственные экспериментальные данные (54 генома), так и геномные секвенсы из международных баз данных. Полученные данные использовались для поиска однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) относительно генома референтного штамма H37Rv и для сравнения с другими геномами MTB, представленными в GenBank в виде протяженных последовательностей (5 образцов) или чтений с приборов высокопроизводительного секвенирования (300 образцов).

На основании сравнительного филогенетического анализа определены 63 кластер-специфических полиморфизма, характерных для представителей клональной группы Beijing B0/W148. Удалось выявить существенные изменения в генах, ответственных за метаболизм патогена (Rv0338c), и в генах эффлюксной системы (Rv1877 и Rv3728). Так же была найдена нонсенс-мутация в гене Rv2719c, продукт которого участвует в клеточном делении. Анализ геномной организации штаммов Beijing B0/W148 показал наличие двух больших инверсий в геноме - 330 и 560 т.п.о, что было подтверждено гибридизационным анализом по Саузерну. Дополнительно была разработана ПЦР-система для детекции инвертированных участков. Согласно нашей гипотезе в ходе первого рекомбинационного события произошла инверсия протяженного сегмента хромосомы длиной 3 м.п.о. Вторая инверсия, произошедшая внутри измененного участка, затронула 2.1 м.п.о. и восстановила ориентацию части внутреннего сегмента хромосомы. Описанные на основании сравнительной геномики полиморфизмы и рекомбинационные события отчасти объясняют “успешность” кластера B0 и могут служить основой для создания систем генетического мониторинга семейства.

S01-03**FOOD LIKINGS AND ISOLATED POPULATIONS GIVE NEW INSIGHT ON THE GENETICS OF FOOD CHOICE.****Nicola Pirastu***Medical Sciences, Chirurgical and Health Department**University of Trieste, Trieste Italy**IRCCS BurloGarofolo, Trieste, Italy*

Food preferences are the first factor driving food choice and thus nutrition. They are influenced by numerous different senses such as taste and olfaction as well as various other factors such as personal experiences and hedonistic aspects. Although it is clear that all of these have a genetic basis, up to now very limited studies have been conducted. Therefore, we have carried out one of the first large scale (4611 individuals) GWAS on food likings assessed for 20 specific food likings belonging to 4 different categories (vegetables, fatty, dairy and bitter). In particular 2311 Italian subjects were used for the discovery step while 1755 from Europe and Central Asia for replication.

Association analysis revealed 16 independent GWAS significant replicated loci/genes (combined $p < 5 \times 10^{-8}$). In particular for Artichokes (CHSY3, LOC100128714 and CCRN4L); Bacon (CNTN5 5.93E-09); Broccoli (KIF2B, RYBP 4.50E-09); Coffee (FIBIN); Chicory (CSMD1 2.56E-09); Dark Chocolate (DFNA5); Blue Cheese (TCF7L18.81E-09); Ice Cream (IRX4); Liver (RNU6-66); Oil or Butter on Bread (BPNT1 3.62E-10); Plain Yogurt (IGLV4-60); White Wine (HLA-DOA) and Mushrooms (C9orf123).

Surprisingly none of the identified genes belong to known taste or olfactory receptors. In particular some of the identified genes can be reconducted to the reward system pathway underlying the importance of this system in food choice. Most of the identified variants show non-additive inheritance suggesting the need of considering alternative genetic models in GWAS. Finally testing for possible effects of the identified variants on referred food consumption on a subset of the samples revealed some concordant overlap, for example rs6661761 in the BNTP1 gene is associated to lower liking of Oil or Butter on bread and to lower calories consumption in particular of starch, sugar and saturated fats.

Our results represent a first step towards unraveling the genetic bases of food liking, and in understanding the its impact on human nutrition in general.

S01-04**CANCER GENOME ANALYSIS TO FIND ESSENTIAL CANCER PROTEINS****Sergei Moshkovskii¹, Mikhail Pyatnitsky¹, Dmitry Karpov²*****¹Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia, ²Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia***

Recent progress in genome sequencing in frame of large cancer studies conferred a new vision of tumor as a result of mutator phenotype. Instead of earlier point of view that a cancer cell is mutated in specific oncogenes or tumor suppressor genes, it became clear that its genome is literally filled up by various somatic mutations. A strategy of survival and evolution of the cancer cell clone is to change its genome quickly given to the damage of DNA repair systems. Some of mutations are drivers of the cancer process and occur in the cancer-related genes. However, most mutations which occur throughout whole genome are not relevant to the tumor progression. They do not help cancer to survive and even may experience a negative selection. In recent works processing a data array from cancer genome sequencing a pivotal attention is paid to the identification of genes significantly mutated in cancer compared to germ line genome. A statistical study made on thousands cancer samples has reported more than 200 cancer genes. The acquisition of mutations in these driver genes is the driving force of malignant transformation.

This study represents an alternative approach to cancer genome data which may add to knowledge on frequently mutated cancer genes. The sites where the number of such mutations is decreased may be actually essential for cancer survival, as the cells with mutations in these sites die and their genomes are not sequenced by cancer projects. Thus, our aim was to find those genes which are not highly mutated, but poorly mutated in comparison to the background of the cancer genome. We looked for the hypomutation phenomenon from viewpoint of protein structure. Our analysis is assumed to be more applicable to those tumors which are triggered by point mutations, other than by copy-number alterations. Those former provide much more statistics on protein sequences to make our prediction robust. We therefore have searched for hypomutated proteins based on melanoma cancer genome data from TCGA. We have defined a cohort of such proteins from those data using dn/ds evolutionary pressure calculation combined with some filters such as overall coding mutation number, quantile gene expression and an influence of each mutation to the protein structure.

S01-05

PROBLEMS AND PERSPECTIVES IN WHEAT GENOME SEQUENCING

Salina E.A.^{1*}, Sergeeva E.M.¹, Nesterov M.A.¹, Magni F.², Frenkel Z.³, Dolezel J.⁴, Korol A.³

1 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 Institute of Applied Genomics, Udine, Italy

3 University of Haifa, Haifa, Israel

4 Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic

The bread wheat *Triticum aestivum* is an allohexaploid ($2n = 6x = 42$, BBAADD), and has the genome size of 17x109 bp, more than 80% of which consists of repetitive sequences. The high standard sequencing of individual wheat chromosomes is in progress. The key to successful chromosome sequencing is the obtaining of physical map of chromosome. Our aim is to develop the physical map for wheat chromosome 5B which bears a number of agronomically important genes such as *Vrn*, *Skr*, *Ne1*, *Ph1*; and has a length nearly 870 Mbp: the short arm (5BS) is of 290 Mbp and the long arm (5BL) is of 580 Mbp.

The chromosome-specific BAC-libraries (Bacterial Artificial Chromosome) obtained for both arms. BAC clones were fingerprinted with SNaPshot method, and assembled using LTC program.

For contig anchoring to the chromosome we constructed the genetic and cytogenetic maps, the BAC-anchoring done by PCR-screening with mapped markers.

The 5BS library consists of 43776 BAC-clones and 5BL library of 76 800 clones, that corresponds to approximately 15-fold coverage. For 5BS we performed the fingerprinting (restriction mapping) of BAC-clones that was consequently assembled into 275 contigs, from them 90 with the size more than 300 kb were design as supercontigs. The largest was 9502 kb in size. A minimal tiling path (MTP) consisting of 316 overlapping BAC clones was covered 258 Mbp (~89%) of chromosome 5BS.

Sixty-one markers mapped to chromosome 5BS were anchored to 29 supercontigs, which contain 1346 BAC clones. In order to link the non-anchored BAC-contigs to chromosome we applied the GenomeZipper approach that uses the collinearity relationship between grass genomes. The 134 BAC-clones from non-anchored contigs were sequenced by IonTorrent method, assembled by MIRA program and compared with coding sequences of *Brachypodium distachyon* genome. The 50 MIRA contigs were assigned to 34 hypothetical genes located from telomere to centromere at the *Brachypodium* chromosome 4, collinear to wheat chromosome 5BS. This allow anchoring the additional 31 supercontigs to physical map of 5BS.

The approach of physical mapping of individual chromosomes of complex genomes provide a foundation for de novo sequencing and construction reference sequence of wheat genome.

S01-06**COMPARISON OF THE 3D ORGANIZATION OF SPERM AND FIBROBLAST GENOMES USING THE HI-C APPROACH****Nariman Battulin¹, Veniamin S Fishman¹, Alexander M Mazur², Mikhail Pomaznoy¹, Anna A Khabarova¹, Dmitry A Afonnikov¹, Egor B Prokhortchouk², Oleg I Serov¹****¹*Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia*, ²*Center of Bioengineering, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia***

The 3D organization of the genome is tightly connected to its biological function. The Hi-C approach was recently introduced as a method that can be used to identify higher-order chromatin interactions genome-wide. The aim of this study was to determine genome-wide chromatin interaction frequencies using the Hi-C approach in mouse sperm cells and embryonic fibroblasts. The obtained results demonstrated that the 3D genome organizations of sperm and fibroblast cells show a high degree of similarity both with each other and with the previously described mouse embryonic stem (ES) cells. Both A- and B-compartments and topologically associated domains (TADs) are present in spermatozoa and fibroblasts. Nevertheless, sperm cells and fibroblasts exhibited statistically significant differences between each other in the contact probabilities of defined loci. Tight packaging of the sperm genome resulted in an enrichment of long-range contacts compared with the fibroblasts. However, only 30% of the differences in the number of contacts are based on differences in the densities of their genome packages; the main source of the differences is the gain or loss of contacts that are specific for defined genome regions. An analysis of interchromosomal contacts in both cell types demonstrated that the large chromosomes showed a tendency to interact with each other more than with the small chromosomes and vice versa. We found that the dependence of the contact probability $P(s)$ on genomic distance for sperm is in a good agreement with the fractal globular folding of chromatin. The similarity of the spatial DNA organization in sperm and somatic cell genomes suggests the stability of the 3D structure of genomes through generations.

S01-07

ALLELEBUILDER: НОВОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА NGS (454 И ILLUMINA) ДАННЫХ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

Сперанская А.С.¹, Криницина А.А.¹, Беленикин М.С.², Кудрявцева А.В.³, Мельникова Н.В.³, Дмитриев А.А.³, Снежкина А.А.³, Садритдинова А.Ф.³, Шаргунов А.В.⁴, Краснов Г.С.³
¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия, ²ФГБУ НПЦ Мед.помощи детям ДЗМ, Москва, Россия, ³ФГБУ ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия, ⁴ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Нами разработано приложение Allele Builder для обработки и анализа данных таргетного секвенирования генов с помощью NGS (454 и Illumina). Последовательность обработки данных в Allele Builder включает следующие шаги: (1) фильтрация ридов с элиминацией дивергентных последовательностей; (2) первичная обработка ошибок прочтения: поиск редких вариантов данного участка (1-5 нукл.) и замещение их на соотв. фрагменты из других наиболее близких прочтений; (3) обрезка 3'-концов с высокой степенью несоответствия с другими, наиболее близкими ридами; (4) исключение рекомбинантных последовательностей, для чего в Allele Builder предложено два алгоритма: "minor fraction" и "de cluster. Второй алгоритм не всегда может быть использован для метагеномных исследований. На заключительном (5) шаге производится кластеризация фильтрованных прочтений и создание консенсусных последовательностей, предположительно соответствующих различным генам.

Разработанное приложение было апробировано при анализе данных секвенирования фрагментов геномной ДНК растений (*5S pPHK*, *ITS* и двухдоменных генов семейства *Pin-II*), полученных на приборе GSJunior (454, Roche).

Allele Builder доступен по адресу: <http://sourceforge.net/p/allelebuilder/>

Работа частично поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития»

S01-08**NEW EVIDENCE OF EXTREME GENOMIC CONSERVATION IN HIGHER EUKARYOTES THROUGH CACHE-OBVIOUS COMPUTING****Andi Dhroso¹, Nathan Johnson¹, Gavin Conant², J. Chris Pires², Dmitry Korkin¹****¹Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA, USA, ²University of Missouri, Columbia, MO, USA**

Genomics is one of the first life science disciplines to enter the era of Big Data, facing challenges in volume, variety, and velocity. Yet, in spite of plethora of sequencing data, we are still far from creating a complete encyclopedia of functional and structural elements of the genome. In 2004, an example of this knowledge gap came about when Bejerano and Haussler discovered 481 DNA elements in the human, mouse and rat genomes that were 100% identical, called the ultraconserved elements (UCEs). Recently, using an advanced data-mining approach, we have shown that this phenomenon exists beyond the animal kingdom and outside the regions of synteny.

Our ultimate goal is to provide a comprehensive atlas of the regions of extreme conservation in higher eukaryotes, which may shed light into the structural organization, function and evolution of these elements. However, this task of all-against-all comparison of dozens of eukaryotic genomes may not be feasible using current approaches. Here, we present a novel cache-oblivious approach to high-throughput detection of extreme genomic elements that combines both algorithmic and hardware optimization. Our algorithm is more than 2,000 times faster than the current state-of-the-art method and is scalable to deal with the unassembled genomes. It has been applied to detect the earliest evidence of extreme conservation by including into the large-scale analysis recently sequenced genomes of coelacanth, elephant shark, and lamprey. The analysis revealed important function linked to the regions of the extreme conservation and suggested the association of the extreme elements with genetic diseases in human.

S01-09

РОЛЬ ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ В ПОДВИЖНОСТИ *SERRATIA MARCESCENS*

Камалетдинова Л.Х.¹, Ширшикова Т.В.¹, Марданова А.М.¹, Шарипова М.Р.¹, Богомольная Л.М.²

¹Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия, ²Техасский Аграрно-Технический Университет, г. Колледж Стэйшн, Техас, США

Одним из важнейших факторов вирулентности патогенных бактерий является их подвижность. Известно, что способность к ползучему росту (роению) способствует колонизации патогенными и условно-патогенными бактериями тканей и слизистых организма хозяина. Большинство возбудителей катетеро-ассоциированных инфекций обладают способностью к роению. Многие бактерии могут передвигаться по плотным поверхностям в виде роя с помощью многочисленных жгутиков; эта разновидность движения носит название «роение». У целого ряда бактерий выявлена способность к перемещению по твердым поверхностям вдоль длинной оси клетки без формирования специальных органелл движения. Такой тип движения обозначают как «плавание».

Целью нашего исследования стало изучение влияния эффлюкс системы MacAB на подвижность клеток *S. marcescens*. *S. marcescens* может вызывать заболевания центральной нервной системы, инфекции мочеполовой системы, болезни дыхательных путей, эндокардит и сепсис. Множественная антибиотикоустойчивость *S. marcescens* объясняется присутствием широкого спектра клеточных насосов (эффлюкс-систем) - белковых комплексов, отвечающих за активное удаление антибиотиков из бактериальных клеток. Наиболее продуктивным методом анализа микробных генов с неизвестной функцией является их инактивация (нокаутирование) с последующим изучением фенотипов мутантных клеток. Начальным этапом работы стала инактивация генов эффлюкс системы MacAB в штаммах *S. marcescens* дикого типа. Ранее в нашей лаборатории был получен штамм *S. marcescens* с инактивированными генами эффлюкс системы MacAB. Инактивация проходила путем замещения генов *macAB* геном устойчивости к хлорамфениколу. Нами был получен фаголизат, содержащий этот фрагмент бактериального генома. Для переноса мутации клетки диких штаммов заражали данным фагом и отбирали трансдуктанты.

Дикий тип *S. marcescens* SM6 способен к двум типам движения – «роению» и «плаванию». Оптимальная температура для подвижности равна 30°C. Однако инактивация генов эффлюкс системы MacAB в штаммах *S. marcescens* приводит к потере способности бактерий к подвижности. Таким образом эффлюкс систему MacAB можно рассматривать как один из факторов вирулентности *S. marcescens*.

S01-10**РЕТРОПОЗОНЫ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭВОЛЮЦИИ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ****Фридман М.В., Макеев В.Ю.*****ИОГен РАН***

В настоящее время хорошо известна роль автономных и неавтономных ретропозонов в образовании микросателлитов в геномах млекопитающих. Образование основной доли микросателлитов происходит в поли-А хвостах ретропозонов, за счёт чего возникают прежде всего А-богатые микросателлиты (типа $(AAAT)_n$). Тем не менее, с ретропозонами связаны и менее А-богатые повторы, например, $(AAGG)_n$, $(AGAT)_n$. Нами показано, что для них характерно соседство с более старыми семействами Alu у человека. Кроме того, для разных видов позвоночных показано соседство таких повторов с более короткими (а значит, более вырожденными) L1-элементами. Это наблюдение свидетельствует о том, что менее А-богатые микросателлиты, вероятно, образуются из А-богатых посредством генной конверсии, которая благоприятствует переходу А в G, поскольку в среднем являются эволюционно более древними. Для анализа закономерностей этого процесса представляется перспективным изучение полиморфизма микросателлитов в соседстве с различными типами ретропозонов и вдали от них.

S01-11**ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ
МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА В ФОРМАТЕ SHOTGUN-СЕКВЕНИРОВАНИЯ****Кострюкова Е.С., Карпова И.Ю., Тяхт А.В., Попенко А.С., Семашко Т.А., Ларин А.К., Говорун В.М.*****НИИ ФХМ. Москва, Россия***

За последние несколько лет в мировой печати появилось большое количество публикаций, посвященных метагеномному анализу микробиоты кишечника человека, выполненных с различными вариантами применения технологий секвенирования. Однако в большинстве работ выбор того или иного метода выделения ДНК из кала и применения того или иного протокола секвенирования специальным образом не обосновывается и не валидируется. Не исключено, что именно этот факт является причиной низкой воспроизводимости, а так же получения противоречивых результатов, наблюдающихся в исследованиях независимых групп. Не вызывает сомнений, что каждый из ключевых этапов – сбор и хранение образцов, выделение ДНК, процедура секвенирования и собственно анализ данных – может оказывать потенциальное влияние на результаты метагеномного анализа. Тем не менее на настоящий момент не существует стандартизованного протокола, который позволил бы обеспечить сопоставимость результатов метагеномных исследований посредством shotgun-секвенирования.

В данной работе мы провели серию экспериментов, позволяющих оценить вклад основных этапов метагеномного анализа – хранения образцов, выделения ДНК из кала, подготовки и секвенирования shotgun-библиотек и анализа первичных данных – в оценку как таксономического, так и функционального состава, и сравнить вариацию, вносимую этими техническими факторами, с биологической вариацией, оцененной по большой контрольной группе метагеномов населения РФ, полученных на одном и том же приборе одним и тем же методом.

Полученные в представленном исследовании результаты позволяют сделать следующие выводы: в рамках используемого подхода к анализу метагеномных данных в формате shotgun-секвенирования возможно сравнение сырых данных, полученных в независимых экспериментах с равной производительностью секвенирования. Основное влияние на результаты метагеномного анализа как на таксономическом, так и на функциональном уровне оказывает этап выделения ДНК из кала и прежде всего – процедура лизиса бактериальной стенки.

S01-12**MINING EVOLUTION SIGNAL FROM METAGENOMIC DATA****Boris Kovarsky¹, Alexander Tyakht¹, Anna Popenko¹, Pavel Mazin², Dmitry Alexeev¹*****¹Research Institute of Physical-Chemical Medicine, ²Institute for Information Transmission Problems RAS***

Most modern metagenomic studies include only functional and taxonomic profiling while very expensive metagenomic data contain much more information about the genomes of organisms in the analyzed community. We developed a robust bioinformatic approach for measuring dissimilarity between the genomes as well as between the gene content of the metagenomic bacterial species. We applied this approach for analysis of 486 human gut metagenomes of individuals from USA, Denmark, China and Russia. For the most abundant microbial species, we correlated place of residence and kinship with the genome differences. We identified different clustering patterns of samples depending on bacterial species. In case of some species, samples are clustered according to their geographic origin, but some species do not demonstrate any geographic-based stratification of samples. For the most abundant bacteria, we assessed their core sets of genes and sets of genes that can be transferred between bacteria.

S01-13

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПОЛНОГО ГЕНОМА БАКТЕРИИ *BACILLUS ALTITUDINIS*, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ОРГАНИЗМА ЮЖНОЙ АМБАРНОЙ ОГНЕВКИ

Шах Махмуд Р., Ульянова В.В., Маланин С.Ю., Дудкина Е.В., Ильинская О.Н.
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский)
федеральный университет, Казань, Россия

Бактерии рода *Bacillus* являются наиболее распространенными спорообразующими сапрофитными почвенными микроорганизмами. Некоторые виды патогенны для человека (*B. anthracis*, *B. cereus*) и насекомых (*B. thuringiensis*). Из организма южной амбарной огневки, являющейся вредителем пищевых продуктов, в середине XX века был выделен штамм бацилл В-388, не образующий эндотоксинов. Согласно проведенной нами генетической идентификации он относится к виду *B. altitudinis*, который был впервые описан в 2006 году, как бактерия стратосферы (41 км высоты). Позже штаммы *B. altitudinis* были выделены из кишечника рыб, ризосферы зернобобовых, отходах животноводства. *B. altitudinis* секретирует ряд внеклеточных гидролаз (рибонуклеаза, протеаза, эстераза, целлюлаза и др.). Из природных источников нами были выделены фаги, поражающие *B. altitudinis*. Для детального изучения генетически детерминированных способностей данного организма мы провели секвенирование его полного генома методом «шотган».

Геномную ДНК *B. altitudinis* В-388 выделяли «фенольным» методом; гомогенность и концентрацию измеряли методом агарозного геля-электрофореза, а также спектрометрически на приборах «NanoDrop», «Qubit 2.0», «2100 Bioanalyzer». Фрагментация хромосомы проходила под давлением ультрачистого азота. Подготовку ДНК, встраивание адапторов, эмульсионную ПЦР, приготовление библиотеки проводили с использованием реактивов и растворов фирмы «Roche». Секвенирование проводили на приборе 454 «GSJunior». Сборку считываний осуществляли с помощью программы «GSDeNovoAssembler», аннотацию и анализ данных - при помощи общедоступных серверов «RAST 2.0» и «PRINSEQ».

В результате секвенирования были получены считывания со средней длиной в 508 нуклеотидов и представляющие около 74,4 млн. п.о. Считывания длиной менее 200 п.о. были удалены. В результате сборки был получен 59 контиг, общей длиной 3,7 млн. п.о. Покрывание генома составило 19,4 х, ГЦ-состав - 41,5%, размер контига N50 = 127734 п.о. В геноме было идентифицировано 76 РНК и 3938 белок-кодирующих последовательностей, представленных в 457 подсистемах.

Авторы выражают глубокую признательность всем сотрудникам «Геномного центра» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета за проведение экспериментов.

S01-14**ЭВОЛЮЦИОННЫЙ КОМПОНЕНТ В МЕТАГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПОЧВЫ****Андронов Е.Е.****ГНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Пушкин**

Этимология термина «метагеномика», очевидно, связана с аристотелевской «метафизикой» и в силу этого обстоятельства первая должна была бы позаимствовать от последней не только механизм словообразования, но и нацеленность на раскрытие наиболее глубоких закономерностей живых систем, осуществляемое в синтезе основных достижений генетики и геномики. Одна из причин, препятствующих раскрытию потенциала метагеномики связана, как нам представляется, с ограниченной длиной прочтения нуклеотидных последовательностей. Динамика развития технологий высокопроизводительного секвенирования свидетельствует о том, что в течение ближайших лет будут доступны технологии, увеличивающие длину прочтения до нескольких десятков тысяч нуклеотидов. Возможно, именно с этого момента начнется новый этап в развитии метагеномных исследований окружающей среды. Однако и при текущем состоянии технологий высокопроизводительного секвенирования существуют области исследований, открывающие совершенно новые перспективы, помимо традиционных направлений, таких как функциональная классификация метагеномов, их кластерный анализ или поиск новых ферментов. Как нам представляется, такими направлениями является популяционная и эволюционная генетика, а именно, анализ причин и механизмов изменчивости. Одним из наиболее интересных и глубоко проработанных объектов популяционных и эволюционных исследований является бобово-ризобияльный азотфиксирующий симбиоз. Как нам представляется, новые технологии секвенирования вдохнули совершенно новую жизнь в эту область исследований.

Работа поддержана грантом РФФ 14-26-00094.

S01-15

DRY MAGIC: GENOME SEQUENCING REVEALS GENOMIC BACKGROUND OF EXTREME DESICCATION TOLERANCE IN THE ANHYDROBIOTIC MIDGE

Takahiro Kikawada¹, Yoshitaka Suetsugu¹, Maria Logacheva², Elena Shagimardanova³, Richard Cornette¹, *P. vanderplanki* genome consortium⁴, Oleg Gusev³

¹National Institute of Agrobiological Sciences, ²Moscow State University, ³Kazan Federal University, ⁴Japan, Russia

Anhydrobiosis represents an extreme example of tolerance adaptation to water loss, where an organism can survive in an ametabolic state until water returns. Here we report the first comparative analysis examining the genomic background of extreme desiccation tolerance, which is exclusively found in larvae of the only anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*. We compare the genomes of *P. vanderplanki* and a congeneric desiccation-sensitive midge *P. nubifer*. We determine that the genome of the anhydrobiotic species specifically contains clusters of multi-copy genes with products that act as molecular shields. In addition, the genome possesses several groups of genes with high similarity to known protective proteins. However, these genes are located in distinct paralogous clusters in the genome apart from the classical orthologues of the corresponding genes shared by both chironomids and other insects. The transcripts of these clustered paralogues contribute to a large majority of the mRNA pool in the desiccating larvae and most likely define successful anhydrobiosis. Comparison of expression patterns of orthologues between two chironomid species provides evidence for the existence of desiccation-specific gene expression systems in *P. vanderplanki*. This work was supported in part by Grants-in-Aids from MEXT/JSPS KAKENHI (Grant Number 21688004, 22128001, 23128512, 23780055, 24120006, 25128714 and 25252060), Japan; subsidy of the Russian Government to support the Program of competitive growth of Kazan Federal University among world class academic centres and universities; Russian Foundation for Basic Research (No 12-08-33157 mol_a_ved and No 14-04-01657_A); grant 11.G34.31.0008 from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation; RFBR and Tatarstan government grant No 12-04-9707.

S01-16**GENOMIC INSIGHTS INTO ACIDOPHILIC PROKARYOTES****Olga Karnachuk, Marat Avakyan*****Department of Plant Physiology and Biotechnology, Tomsk State University, Tomsk, Russia***

Acidophilic Bacteria and Archaea thrive in acidic environments associated with volcanic activity or mining for metal sulfide ores. Sulfur- and iron-oxidizing acidophiles are used for the commercial extraction of a variety of metals from their ores or concentrates by the process called bioleaching.

More than 50 genomes of acidophilic Bacteria and Archaea are available. This fact allows to search for the mechanisms of resistance to high proton concentration outside the microbial cell. The mechanisms to be discussed include: (1) the generation of positive internal potential ($\Delta\psi$) to create a chemosmotic barrier preventing proton influx; (2) increased number of secondary transporters in the acidophile membranes; (3) exploitation of various proton-consuming decarboxylases.

Emphasis will be placed on the sulfate-reducing acidophiles that precipitate metals from the solution in the form of highly insoluble sulfides. This trait is used in various on- and off-site bioremediation schemes. Numerous reports of microbial sulfate reduction at low pH provide reasonable grounds to expect a substantial number of acidophilic/acidotolerant sulfate-reducing prokaryotes (SRP) thriving in acidic environments. However, surprisingly low numbers of cultivated organism are documented. More than 80 available SRP genomes were searched for the plausible mechanisms to withstand low pH environments. The conclusions drawn from a bioinformatic approach were cross-checked by physiological experiments and the isolation of new cultures. The genome search and physiological experiments showed that ability to grow at low pH may be hidden in traditional neutrophilic groups.

We acknowledge support from the Russian Science Fund (contract number 14-14-00427) and the Russian Ministry of Education and Science (contract number 14.575.21.0067).

S01-17

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДИКОГО ШТАММА *SERRATIA MARCESCENS* И ЕГО МУТАНТА ПО ГЕНАМ ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ К АКТИВНЫМ ФОРМАМ КИСЛОРОДА.

Камалетдинова Л.Х.¹, Шишкикова Т.В.¹, Марданова А.М.¹, Шарипова М.Р.¹, Богомольная Л.М.²

¹Казанский федеральный университет, ИФМиБ, г. Казань, ²Техасский Аграрно-Технический Университет, г. Колледж Стэйшн, Техас, США

Одной из самых актуальных проблем в современном мире является развитие антибиотикоустойчивости бактерий. Биоинформационный анализ геномной последовательности *S. marcescens* позволил выявить новую эффлюкс систему ABC-типа, которая не исследована у *S. marcescens*, но гомологична MacAB системе *E. coli*.

Целью нашего исследования стало определение чувствительности дикого штамма *S. marcescens* SR41-8000 и его мутанта по генам *macAB* к активным формам кислорода. Начальным этапом работы стала инактивация генов эффлюкс системы MacAB в штаммах *S. marcescens* дикого типа. Ранее в нашей лаборатории был получен штамм *S. marcescens* с инактивированными генами эффлюкс системы MacAB. Инактивация проходила путем замещения генов *macAB* геном устойчивости к хлорамфениколу. Нами был получен фаголизат, содержащий этот фрагмент бактериального генома. Для переноса мутации клетки диких штаммов заражали данным фагом и отбирали трансдуктанты. Особенностью эффлюкс системы MacAB заключается в том, что, помимо защиты бактерий от антибиотиков, она также защищает их от активных форм кислорода. Наибольшая разница в динамике роста штаммов наблюдалась на 3 час культивирования: перекись водорода приводит к снижению ОП культуры мутантного штамма в 2 раза по сравнению с ОП исходного штамма. Однако на 6 час культивирования различие в ОП культур значительно снижалось. Это может быть связано с исчезновением перекиси водорода из среды в результате разложения этого нестабильного соединения или с ее инактивацией бактериальными метаболитами.

S01-18

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА АНАЭРОБНЫХ РЕАКТОРОВ, УТИЛИЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЧЕСКИЕ ОТХОДЫ ЖИВОТНОВОДСТВА

Ваньков П.Ю.¹, Зиганшина Э.Э.¹, Белостоцкий Д.Е.², Шушляев Р.В.², Милюков В.А.²,
 Зиганшин А.М.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, ул.

Кремлевская, дом 18, ²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
 КНЦ РАН, 420088, г. Казань, ул. Арбузова, дом 8

Анаэробная микробная конверсия биомассы на сегодняшний день считается одной из эффективных технологий, позволяющих перевести первоначальную энергию биомассы в топливо, в частности в биогаз, а также привлекательным решением вопроса рациональной утилизации различных органических отходов. Для эффективной анаэробной биodeградации различной биомассы с получением биогаза важно поддерживать как биотехнологические параметры анаэробного процесса в пределах оптимальных значений, так и функционирование микробных сообществ, осуществляющих сложные биохимические реакции гидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза и метаногенеза.

В данной работе исследована структура микробных сообществ, осуществлявших анаэробную переработку индюшачьего помета с опилками (P₁), а также совместную переработку куриного помета и свиного навоза (P₂). В ходе исследований определен ряд ключевых параметров анаэробного процесса в лабораторных реакторах с непрерывным перемешиванием субстрата. Значения концентраций органических кислот и ионов аммония в реакторе P₂ оценивались как высокие, а именно 13.9–15.2 г л⁻¹ и 3.3–3.7 г л⁻¹ соответственно. Выход биогаза из данного реактора также оказался повышенным и достигал 366 мл г⁻¹_{осв.}. Очень низкий выход биогаза был отмечен в реакторе, утилизовавшем индюшачий помет (не более 195 мл г⁻¹_{осв.}). В данном реакторе значения концентрации органических кислот находились в пределах 1.5–1.8 г л⁻¹, а ионов аммония – в пределах 1.6–1.7 г л⁻¹.

Амплификация, клонирование и секвенирование бактериальных генов 16S рПНК, а также T-RFLP-анализ с использованием рестриктаз выявили относительно большое разнообразие представителей порядка *Clostridiales*, интенсивно участвующих в реакциях гидролиза субстрата и ацидогенеза, в обоих реакторах (T-RF–239, T-RF–267 в P₁ и T-RF–297 в P₂). T-RFLP-анализ в сочетании с созданием библиотеки клонов генов 16S рПНК архей показал, что метаногенные сообщества в обоих реакторах были представлены археями рода *Methanosarcina*, однако доминирующие представители данного рода в реакторах различались. Кроме того, в реакторе P₂ были также многочисленны представители строгого гидрогенотрофного рода *Methanoculleus*.

S01-19

ЭВОЛЮЦИЯ ПЛАСТИДНОГО ГЕНОМА НЕФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРХИДЕЙ

Матвеева Мария Владимировна¹, Логачева Мария Дмитриевна², Гусев Олег Александрович¹

¹Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия, ²Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Способность к фотосинтезу - одна из ключевых характеристик растений. Пластиды - органеллы симбиотического происхождения, играют ключевую роль в данном процессе и имеют собственный геном. Геном пластид (пластом) кодирует часть белковых систем, относящихся к фотосинтезу, транскрипции и трансляции. Потеря фотосинтетической активности у некоторых растений приводит к необратимой смене типа питания с автотрофного на гетеротрофный. По-видимому, это ведет к ослаблению воздействия отбора на гены пластид и может теоретически привести к полному исчезновению генома. Несмотря на это, подавляющее большинство нефотосинтезирующих растений сохраняют пластидные геномы, хотя и в сильно редуцированном состоянии. Гены рибосомных, а также транспортных РНК и рибосомных белков присутствуют в пластомах повсеместно даже в редуцированном состоянии. Это дает основания предположить, что в пластидах нефотосинтезирующих растений происходит трансляция, что свидетельствует о дополнительных функциях этой органеллы. Данные функции пока неясны и требуют уточнения с помощью сравнительного анализа геномов.

Одной из моделей для изучения структуры и эволюции пластидных геномов в отсутствие фотосинтеза является пластидный геном орхидей - крупного семейства цветковых растений, включающего в себя виды, независимо друг от друга перешедшие на гетеротрофный тип питания.

Мы секвенировали, собрали пластидный геном *Cephalanthera exigua*, микогетеротрофной орхидеи, относительно недавно сменившей тип питания, и получили его предварительную аннотацию с помощью DOGMA и BLAST.

В качестве образца для сравнения использовали родственный фотосинтезирующий вид *Epipactis helleborine* (дремликзимовниковый, или широколистный), который является типовым видом рода Дремлик семейства Орхидные. Аннотация показала редукцию пулов генов фотосистем 1 и 2, комплекса цитохромов b6/f, CF1FO-ATP - синтазы, рибосомальных белков. Дополнительный анализ позволит получить более точные данные по функциям генов, кодируемых пластомом.

S01-20**МОДЕЛЬ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ГЕНОМОВ ПРИ ПЕРЕХОДЕ ОТ
ХОЛОДНОКРОВНЫХ К ТЕПЛОКРОВНЫМ ПОЗВОНОЧНЫМ****Карпова Ольга Игоревна¹, Сизова Татьяна Викторовна²****¹Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва,
Россия, ²Институт Общей Генетики им. Н.И.Вавилова, Москва, Россия**

Изохоры - протяженные, достаточно гомогенные по GC-составу участки хромосом, тесно связанные с рядом основных биологических свойств. Показано, что при происхождении позвоночных животных GC-богатые изохоры возникли в результате увеличения состава оснований более GC-богатой изохоры холоднокровного предка. Молекулы ДНК гомологичных хромосом на стадии профазы I деления мейоза организованы в фибриллы хроматина, которые в виде петель прикреплены к боковым элементам синаптонемного комплекса. СКАР ДНК - семейство последовательностей геномной ДНК, лежащих в основаниях петель, обладающих рядом специфических свойств и обогащенных консервативными последовательностями. Определена плотность распределения последовательностей СКАР ДНК в разных изохорных компартаментах геномов золотистого хомячка, человека и цыпленка. Сделан вывод о том, что в разных изохорных компартаментах исследованных геномов длины петель ДНК, прикрепляющихся к СК, различны и изменяются сходным образом. Оценено количество генов в петлях ДНК. Предложена модель преобразования геномов в процессе становления теплокровных позвоночных, согласно которой происходило не только увеличение GC-состава во многих участках геномов но и сокращение длин некодирующих и не значимых функционально участков ДНК, а также хромосомные перестройки, приводящие к объединению сокращающихся изохор.

S01-21

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *B. PUMILUS*

Черёмин Андрей Михайлович, Шарипова Маргарита Рашидовна

Казанский (Приволжский) федеральный университет. Казань, Россия

Сериновые протеиназы бактерий представляют интерес для понимания физиологии микробной клетки, а также находят практическое применение. При истощении питательной среды, бактерии синтезируют ферменты деградации, среди которых большую часть составляют сериновые протеиназы. Синтез таких ферментов контролирует двухкомпонентная система трансдукции сигнала DegS-DegU. Бактерии *Bacillus pumilus* секретируют в среду сериновую субтилизиноподобную протеиназу, занимающую 70% от общего количества внеклеточных ферментов. Целью работы явилось повышение экспрессии субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* с неизменной первичной структурой. С помощью сайт-направленного мутагенеза в гене фермента были изменены 2 сайта взаимодействия с фактором транскрипции DegU на консенсусные последовательности (уровень гомологии 100%). Промотор с неизменной последовательностью был использован в качестве контроля. Все промоторы были клонированы в вектор, содержащий репортерный ген *lacZ* и трансформированы в дикий штамм *B. subtilis* 168. Методом ПЦР в режиме реального времени было показано, что при модификации одного из сайтов уровень мРНК гена *lacZ* увеличился в 52 раза относительно контроля. Таким образом, в результате модификации промоторной области гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* мы добились повышения экспрессии этого белка. Полученный метод с модификацией промоторной области гена может быть применен при создании штаммов с повышенной экспрессией целевого белка, не сопровождаемой изменением его первичной структуры.

S01-22**ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ЕВРАЗИИ****Хуснутдинова Э.К.¹, Литвинов С.С.¹, Юнусбаев Б.Б.¹, Трофимова Н.В.¹, Виллемс Р.²****¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г.Уфа, Россия, ²Эстонский биоцентр, г.Тарту, Эстония**

Нами проведен полногеномный анализ 650000 SNPs популяциях Евразии (Волго-Уральского региона, Кавказа, Средней Азии и Сибири). Впервые получено наиболее детальное и подробное представление о генетической структуре 24 этнических групп Кавказа. Показано, что популяции Кавказа демонстрируют существенно более единообразную генетическую структуру, чем можно было бы предполагать, исходя из выраженного этнического и лингвистического разнообразия региона. Установлено, что их формирование происходило на основе гетерогенного генетического субстрата переднеазиатского происхождения с последующим существенным дрейфом генов в изолированных популяциях. Впервые показано существование отчетливого потока генов из популяций Восточной Европы в популяции Кавказа. В популяциях Волго-Уральского региона (ВУР) обнаружены генетические компоненты, имеющие различное происхождение, связанное как с западно- и восточно-евразийскими источниками, так и в меньшей степени, с Передней Азией, что согласуется с лингвистическими и антропологическими данными о сложности этногенеза народов данного региона. Этнические группы ВУР демонстрируют различную степень вклада компонентов Восточной Евразии и Сибири в генетический пул изученного региона. Популяция якутов обладает характерной генетической составляющей, которую можно оценить как сибирский компонент. Очевидно, этот компонент распространился на достаточно обширную территорию, включая Среднюю Азию и Волго-Уральский регион. Анализ главных компонент позволил обнаружить сходство генетической и географической составляющих в изученных популяциях Евразии. В результате сравнительного анализа геномов 22 тюркоязычных народов Евразии по данным полногеномного анализа SNPs впервые показано Южносибирское происхождение единого генетического пласта у всех тюркоязычных групп.

S01-23

ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА ФИТАЗЫ *BACILLUS GINSENGIHUMI* В МОДЕЛЬНОМ РАСТЕНИИ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Нямсүрэн Ч.¹, Валеева Л.Р.¹, Нигматуллина Л. Р.¹, Шакиров Е.В.², Шарипова М.Р.¹

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,*

²*420008, University of Texas at Austin, Austin, TX, 78712 USA*

Целью работы явилось получение генетически модифицированных растений *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующих ген бактериальной фитазы *Bacillus ginsengihumi* (phyCg). Ген фитазы клонировали в бинарный вектор *pCBK05* под контролем растительного промотора *Pht1;2*. Экспрессия промотора *Pht1;2* происходит в эпителиальных клетках корней *A. thaliana* и индуцируется недостатком неорганического фосфора. Конструкция содержала последовательности, кодирующие сигнальный пептид экстенсина AtExt3 и 3'-концевые His и Strep. Провели трансформацию *A. thaliana* рекомбинантными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Селекцию трансформантов проводили на среде MS (Murashige-Skoog) с добавлением гербицида BASTA. В результате получено 5 независимых чистых линий трансгенных *A. thaliana*. С помощью метода обратной транскрипции определили экспрессию гена бактериальной фитазы на уровне РНК в корнях растений. С помощью иммуноблоттинга установили наличие бактериальной фитазы в белковых экстрактах корней *A. thaliana*. Исходя из вышесказанного, установлено, что ген фитазы экспрессируется как на уровне транскрипции, так и трансляции. Таким образом, нами получены трансгенные растения, экспрессирующие микробные гены фитазы в корнях растений.

S01-24**ТРАНСПОЗОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ПРИ ПОМОЩИ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА MINI-TN4001TET-MGA****Капицкая К. Ю., Горбачев А. Ю., Фисунев Г. Ю., Говорун В. М.****ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России**

Mycoplasma gallisepticum вследствие малых размеров и небольшого числа генов является удобным модельным объектом для изучения принципов организации минимальной живой системы. При этом манипулирование генетическим материалом микоплазм является чрезвычайно сложной и трудоемкой задачей, для решения которой существует весьма ограниченный арсенал методов. В частности, для подавления экспрессии генов у *M. gallisepticum* используется только метод транспозонного мутагенеза.

В настоящей работе предположен вариант модификации транспозонного вектора *pmini-Tn4001tet* с целью повышения эффективности его использования для генного нокаута у *M. gallisepticum*. Как и в исходном векторе, полученная конструкция содержала ген *tetM*, определяющий устойчивость к тетрациклину, а также ген *trn*, кодирующий белок транспозазу, необходимый для осуществления встраивания конструкции в геном. При этом перед последовательностями генов *trn* и *tetM* были встроены последовательности сильных эндогенных промоторов и сайты связывания рибосом из *M. gallisepticum*. Кроме того, нуклеотидный состав встраиваемой в геном конструкции был оптимизирован в соответствии с частотами использования кодонов у *M. gallisepticum*.

В ходе работы были подобраны оптимальные условия трансформации клеток *M. gallisepticum*. Эффективность трансформации составила 10^{-6} на 10нг плазмиды, что выше, чем эффективность трансформации, описанная для исходного вектора. В результате была получена библиотека из 100 мутантов, для каждого из которых локализация вставки определена методом «прогулки по хромосоме».

S01-25

**ФИТАЗА *PANTOEA AGGLOMERANS*: ЭКСПРЕССИЯ В
ARABIDOPSIS THALIANA ПОД КОНТРОЛЕМ ВИРУСНОГО ПРОМОТОРА**

Трошагина Д.С.¹, Валеева Л.Р.¹, Частухина И.Б.¹, Шакиров Е.В.², Шарипова М.Р.¹

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,*

Россия, ²University of Texas at Austin, Austin, USA

Фитат - труднодоступная для растений органическая форма фосфора. Способностью к гидролизу данного соединения обладают бактерии при помощи внеклеточных ферментов фитаз.

Целью работы явилось получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, содержащих ген фитазы бактерии *Pantoea agglomerans* (*PaPhyC*) под контролем промотора *CaMV 35S*. Растения трансформировали с помощью рекомбинантных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущих ген *paPhyC*, ген устойчивости к селективному гербициду BASTA, сигнальную последовательность гена экстенсина *ex*, *His-Strep-tag* последовательности и промотор *CaMV 35S*. Были получены линии растений с единичной копией гена, что подтверждено с помощью ПЦР с использованием праймеров к гену фитазы. Экспрессию модифицированного гена *PaPhyC* на транскрипционном уровне подтвердили секвенированием продуктов амплификации кДНК. Методом иммуноблоттинга установили экспрессию белка фитазы в тканях трансгенных растений. Молекулярный вес продукта соответствовал молекулярной массе бактериальной фитазы.

Создание конструкций, обеспечивающих секрецию микробного фермента в ризосферу, может быть важным этапом для решения проблемы фосфорного питания растений.

S01-26**ЭВОЛЮЦИОННЫЙ КОМПОНЕНТ В МЕТАГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПОЧВЫ****Андронов Е.Е.¹⁾, Иголкина А.А.¹⁾, Порозов Ю.Б.²⁾****ГНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Пушкин****НИУ ИТМО, Санкт-Петербург**

Этимология термина «метагеномика», очевидно, связана с аристотелевской «метафизикой» и в силу этого обстоятельства первая должна была бы позаимствовать от последней не только механизм словообразования, но и нацеленность на раскрытие наиболее глубоких закономерностей живых систем, осуществляемое в синтезе основных достижений генетики и геномики. Однако, как показывает анализ научных публикаций в области почвенной метагеномики, текущее состояние можно было бы описать, скорее как «первоначальное накопление научного капитала», чем «раскрытие глубоких закономерностей». И причина этого, как нам представляется, не в последнюю очередь лежит в текущих технологиях высокопроизводительного секвенирования и, прежде всего, в ограниченной длине прочтения нуклеотидных последовательностей. Динамика развития технологий высокопроизводительного секвенирования свидетельствует о том, что в течение ближайших лет будут доступны технологии, увеличивающие длину прочтения до нескольких десятков тысяч нуклеотидов. Как нам представляется, именно с этого момента начнется новый этап в развитии метагеномных исследований окружающей среды.

Однако и при текущем состоянии технологий высокопроизводительного секвенирования существуют области исследований уже сегодня вполне оправдывающие все еще высокие затраты на метагеномные исследования. Как нам представляется, такими направлениями является популяционная и эволюционная генетика, а именно, анализ причин и механизмов изменчивости. Одним из наиболее интересных и глубоко проработанных объектов популяционных и эволюционных исследований является бобово-ризобияльный азотфиксирующий симбиоз. Как нам представляется, новые технологии секвенирования вдохнули совершенно новую жизнь в эту область исследований. В настоящем сообщении будут представлены первые результаты исследования изменчивости симбиотических генов ризобий, ответственных за синтез nod-фактора – ключевого компонента молекулярного диалога растения и бактерии в ходе развития азотфиксирующего симбиоза. Уже первые результаты анализа библиотек симбиотических генов с использованием высокопроизводительного секвенирования позволили не только детектировать реальную изменчивость в симбиотических генах ризобий, но и наглядно продемонстрировать некоторые феномены, касающиеся популяционной и эволюционной генетики симбиотических систем. Уже сегодня вырисовываются интереснейшие перспективы синтеза технологий высокопроизводительного секвенирования, эволюционной и популяционной статистики, молекулярного моделирования и докинга, которые могут и составить один из существенных, обладающих высоким эвристическим потенциалом компонентов будущей метагеномики.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-01371-а.

S01-27

EVALUATION OF THE BIO DIVERSITY OFF 2 INTERSPECIES HYBRIDS OF WILD (OVIS AMMON) AND DOMESTIC (OVIS ARIES) SHEEP USING STR MARKERS

Gladyr E.A. 1, Bagirov V.A. 1, Brem G. 1,2, Zinovieva N.A.1

1 L.K. Ernst Institute of Animal husbandry, Dubrovitzky, Russia

2 Institute of animal breeding and genetics, VMU, Vienna, Austria

Maintenance of agricultural animal biodiversity has a great importance for development of sustainable food production systems. The large contribution to genetic diversity of agricultural animal species is made by the local livestock breeds and aboriginal animal populations. The other possible way to improve the genetic diversity of animal species used for food production is the introduction of wild species into the breeding programs of farm animals.

The aim of the present study was to evaluate the allele pool of F2 interspecies hybrids between wild sheep (*Ovis Ammon*) and domestic sheep (*Ovis Aries*) using short tandem repeats (STR) as genetic markers.

In total 58 animals including group of 29 F2 hybrids ($\frac{1}{4}$ *Ovis ammon* x $\frac{3}{4}$ Romanov sheep) and group of 29 pure-bred Romanov sheep were analyzed using 11 high-polymorphic STRs as described earlier (1-3). The data analysis was performed by standard methods (4) using GenAlEx (v. 6.5) software (5).

The high level of genetic diversity was shown in both groups: the average number of alleles per loci was 7.18 and 6.91, the average number of the effective alleles per loci was 4.02 and 3.80 in hybrid animals and pure-bred Romanov sheep, respectively. In nine of eleven loci 39 private alleles were identified whereas 18 alleles were found in Romanov sheep and 21 alleles were detected in hybrids.

Analysis of the differentiation degree showed, that 77.1% of common genetic diversity was caused by within individuals' differences, 18.1% was due to between individuals' differences and only 4.8% of diversity was caused by differences between groups. The number of polymorphic loci was 100% in both of groups analyzed. The assignment analysis allowed correctly refer to their own group 93.1% hybrid animals and 100% pure-bred Romanov sheep. The value of genetic distance calculated by Nei (6) showed clear genetic differentiation of two analyzed groups (0.220).

Researches were performed under financial support of Russian scientific foundation, project No, 14-36-00039.

Зинovieва, Н.А., Гладырь Е.А. Достижения науки и техники АПК. 2011, № 9, с. 19-20; 2. Гладырь Е.А., Зинovieва Н.А., Брем Г. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2004, № 2, С. 26; 3. Гладырь Е.А., Зинovieва Н.А., Бурылова С.С., Селионова М.И., Моисейкина Л.Г., Эрнст Л.К., Брем Г. Достижения науки и техники АПК. 2012. № 11. С. 34-37; 4. Вейр Б. Анализ генетических данных // М.: Мир, 1995, 319; 5. Peakall, R., Smouse P.E. Bioinformatics, 2012, 28 (19), 2537-2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460; 6. Nei M. Genetics, 1978, 89: 583-590.

S01-28**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ LIG3 И ХРА У РАБОТНИКОВ УРАНОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В КАЧЕСТВЕ ОЦЕНКИ НАГРУЗКИ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

Абильмажинова Алия Темиргалиевна, Жабагин Максат Кизатович, Бахтин Мейрат Мухамедкаримович, Казымбет Полат Казымбетович, Акильжанова Айнур Рахметуловна.
Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

Институт радиобиологических исследований, Медицинский Университет Астаны, Астана, Казахстан

Принимая во внимание тот факт, что Казахстан является одним из мировых лидеров по добыче урана, а также учитывая масштабы ущерба, причиненного в результате работы Семипалатинского испытательного ядерного полигона, общий средовой фон некоторых регионов оказался под влиянием дополнительного воздействия хронического облучения малыми дозами радиации. Целью нашего исследования являлось определение влияния ионизирующего излучения на экспрессию генов у работников урановой промышленности города Степногорск, подвергающихся хроническому облучению. По литературным данным известно, что экспрессия генов LIG3 и ХРА, участвующих в регуляции репарации ДНК, может выступать в качестве чувствительных биологических маркеров дозиметрии ионизирующих излучений.

В исследование были приглашены работники урановой промышленности группы А (N=20), подвергающиеся излучению не более 50мЗв в год, и группы Б (N=19), подвергающиеся излучению не более 20 мЗв в год. Все участники дали информированное согласие на участие. Произведен забор венозной крови в специальные пробирки TempusBlood RNA. РНК была выделена из цельной крови конвертирована в кДНКпо протоколу StabilizedBlood-to-CT™ NucleicAcidPreparationKit (Lifetechnologies). Определение экспрессии образцов проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени на амплификаторе 7900HT (AppliedBiosystems) с набором TaqMan зондов. В качестве эндогенного контроля был использован ген B-actin.

Данные экспрессии генов LIG3 и ХРА были проанализированы и в сравнены между группами А и Б в программном обеспечении SDSRQmanager. Анализ экспрессии данных генов показал значимую разницу в экспрессии генов между двумя группами. Повышение экспрессии генов LIG3 и ХРА наблюдалось в группе с повышенной дозой облучения. Экспрессия гена LIG3 в группе А была в 5.96 раз больше чем в группе Б. Экспрессия гена ХРА в группе А была в 7.65 раз больше чем в группе Б. Наблюдаемые изменения профиля экспрессии таких генов можно использовать в качестве биомаркера дозиметрии в урановой промышленности для оценки нагрузки облучения промышленных работников.

S01-29

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В КАЗАХСТАНЕ: ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДВУХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ

У.Каиров¹, А.Молкенов¹, У.Кожамкулов¹, С.Рахимова¹, А.Аскапулы¹, М.Жабагин¹,
 Ж.Абилова¹, А.Ахметова¹, Д.Ережепов¹, А.Абильмажинова¹, В.Бисмилда², Л.Чингисова²,
 Ж.Жумадилов¹, А.Акильжанова¹

¹*Департамент геномной и персонализированной медицины, Центр Наук о жизни Назарбаев Университет, Астана, Казахстан*

²*Национальный центр проблем туберкулеза Республики Казахстан, Алматы, Казахстан*

Проект направлен на создание предпосылок для персонализированного подхода к диагностике и лечению туберкулеза, выявления и сравнения всей полногеномной последовательности штаммов *M.tuberculosis*, выделенных в Казахстане. Анализ полных нуклеотидных последовательностей генома, полученных с использованием технологии секвенирования нового поколения, будет определять факторы, которые способствуют формированию высоковирулентных штаммов *M.tuberculosis*, особенности эволюции местных циркулирующих штаммов и генетические маркеры, обуславливающие лекарственную устойчивость.

Создана коллекция ДНК *M.tuberculosis* от больных туберкулезом с различным профилем лекарственной устойчивости. Забор мокроты, посев материала и определение лекарственной чувствительности проводили в референс-лаборатории Национального центра проблем туберкулеза Республики Казахстан. Библиотеки ДНК для полногеномного секвенирования были подготовлены из ДНК клинических изолятов согласно инструкции фирмы производителя. Полногеномное секвенирование штаммов *M.tuberculosis* проводили на платформе Roche 454 GSFLX+с использованием технологии секвенирования нового поколения в Центре наук о жизни Назарбаев Университета, Астана. Риды секвенирования двух изолятов были собраны в контигис использованием программы GS De Novo Assembler. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с референсной последовательностью штамма *M.tuberculosis* H37Rv с использованием программы GS Reference Mapper.

Полногеномное секвенирование *M.tuberculosis* проводили для двух клинических изолятов *M.tuberculosis* MTB-476 и MTB-489. Для штаммов MTB-476 и MTB-489 были получены 96 Мб п.н. со средней длиной считывания 520 п.н. и покрытием 21.8X, а также 104,2 Мб п.н. со средней длиной считывания 589 п.н., покрытие 23.7X соответственно. Геном MTB-476 состоит из 257 контигов, 4204 белок кодирующих последовательностей, 46 тРНК и 3 рРНК, MTB-489 имеет 187 контигов, 4183 белок кодирующих последовательностей, 45 тРНК и 3 рРНК. Результаты сборки геномов были внесены и опубликованы в NCBI GenBank и доступны для просмотра под номерами AZBA00000000 и AZAZ00000000. Дальнейшая работа ведется по детальному анализу результатов секвенирования геномов, по генотипированию клинических изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Казахстана.

S01-30

ПОЛНЫЕ ТРАНСКРИПТОМЫ КАЗАХСТАНСКИХ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПИЩЕВОДА: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ

Каиров У.Е.¹, Рахимова С.Е.¹, SeungbokLee², Молкенов А.Б.¹, Jong-IlKim², Jeong-sunSeo², Жумадилов Ж.Ш.¹ и Акильжанова А.Р.¹

¹Департамент геномной и персонализированной медицины, Центр Наук о Жизни, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан.

²Институт Геномной Медицины ILCHUN, Сеульский Национальный Университет, Корея.

Рак пищевода является одной из 10 наиболее распространенных и смертельных злокачественных опухолей в мире имеет заметное географическое изменение показателей заболеваемости между странами и внутри стран. Плоскоклеточный рак пищевода является преобладающим типом рака пищевода во всем мире, составляющий почти 95% случаев. Плоскоклеточный рак пищевода больше распространен в развивающихся странах, тогда как аденокарцинома пищевода чаще наблюдается в развитых странах в ассоциации с пищеводом Барретта. Традиционно казахи предпочитают пить горячий отварной чай, едят в положении лежа и т.д., вызывающих травматические поражения пищевода и эзофагит. Несмотря на высокую распространенность, плоскоклеточный рак пищевода не достаточно интенсивно изучен, в отличие от аденокарциномы пищевода. Молекулярные механизмы, способствующие инициации и прогрессированию плоскоклеточного рака пищевода все еще плохо изучены. Однако отсутствие наличия чувствительных и специфичных биомаркеров для диагностики плоскоклеточного рака пищевода подчеркивает необходимость дополнительных исследований по изучению процессов опухоли образования.

Материалы и методы. Для подготовки РНК были собраны сорок два образца тканей (21 нормальных и 21 раковых) от пациентов казахской популяции с раком пищевода. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Takara RNA Isolation и проводили очистку набором QiagenRNA Purification. Качественную и количественную оценку извлеченной РНК проводили с использованием RNA 6000 NanoLabChip на анализаторе 2100 Bioanalyzer (Agilent). Секвенирование полных транскриптомов проводили на 10 образцах тканей (5 нормальных и 5 раковых образцов) у казахстанских пациентов с раком пищевода с применением платформы секвенирования нового поколения Illumina HiSeq2000. Все сгенерированные *.bcl файлы конвертировались и демультиплексировались с помощью bcl2fastq. РНК риды были выравнены с помощью Tophat2. Определение уровня экспрессии генов проводили с использованием HTSeq, а анализ дифференциальной экспрессии генов с помощью DESeq. Поиск сигнальных путей и биологических функций проводили на основе баз данных MSigDB и KEGG Pathway.

Результаты. Завершено выравнивание последовательностей, определение экспрессии генов и анализ дифференциально экспрессированных генов в десяти образцах тканей у пяти казахских пациентов. Мы обнаружили 287 низко-экспрессированных и 192 высоко-экспрессированных генов при сравнении раковой и нормальной тканей. На основе анализа баз данных MSigDB и KEGG Pathway идентифицировали 10 и 4; 10 и 10 перекрывающихся генных сетей среди низко-экспрессированных и высоко-экспрессированных генов, соответственно.

S01-31

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Волков Илья Алексеевич

ООО «Агентство Химэксперт»

Методы NGS применимы для выявления практически всех эпигенетических маркеров (метилированная ДНК; ацетилированные гистоны; белки, взаимодействующие с ДНК; микроРНК) - ChIP-Seq, MeDIP, 5C, RNA-Seq. NGS отличает невысокая стоимость метода относительно количества получаемых данных.

Молекулярная основа эпигенетики достаточно сложна при том, что она не затрагивает структуру ДНК, а изменяет активность определенных генов [1].

С появлением массового параллельного секвенирования методы эпигенетических исследований значительно повысили производительность и увеличили полезный объем конечных данных. Методы NGS применимы для выявления практически всех эпигенетических маркеров (метилированная ДНК; ацетилированные гистоны; белки, взаимодействующие с ДНК; микроРНК).

Совмещение метода иммунопреципитации хроматина и высокопроизводительного секвенирования (ChIP-Seq) позволяет картировать по всему геному сайты связывания белков, а сравнение контрольной библиотеки ДНК и библиотеки после бисульфитной конверсии позволяет проводить полногеномное картирование эпигенетических маркеров (метилирование генома). Для определения паттерна метилирования применяют также метод иммунопреципитации метилированной ДНК с последующим секвенированием (MeDIP-seq). Метод 5C для изучения пространственной структуры хромосом включает этап NGS анализа и позволяет искать участки ДНК, которые взаимодействуют с несколькими выбранными участками генома [2].

Ключевые моменты применения NGS в эпигенетике:

- геномные исследования без предварительного знания последовательностей интересующих участков ДНК;
- невысокая стоимость относительно количества получаемых данных;
- дискриминация близкородственных последовательностей ДНК;
- цифровой формат данных упрощает сравнение результатов;
- возможность обнаружения редких последовательностей [3].

[1] «Эпигенетика: как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности», 2012.

[2] A Torrent of Data: Mapping Chromatin Organization Using 5C and High-Throughput Sequencing, 2012.

[3] Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research, 2009.

S01-32**ИММУНОГЕНЕТИКА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА К НЕГАТИВНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ****Кофиади И.А., Алексеев Л.П.****ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России**

Индивидуальные фенотипические различия организмов одного вида связаны с существованием аллельного полиморфизма генов. Различные варианты одного гена могут кодировать молекулы с существенно отличающимися биохимическими характеристиками, что отражается на функциональных особенностях конкретного организма, в том числе на его восприимчивости к негативным факторам окружающей среды. Ключевой системой, контролирующей механизмы защиты и восстановления организма в ответ на внешнее воздействие, является иммунная система. Таким образом, гены иммунной системы определяют устойчивость и восприимчивость человека к негативным факторам окружающей среды, а также риск развития отдаленных последствий действия этих факторов. В связи с этим, одним из наиболее перспективных направлений современной иммунологии и медико-биологической науки в целом, является иммуногенетика.

В настоящее время диагностика функциональных и клинических признаков ведется, как правило, средствами прямого измерения активности (концентрации) маркера патологического процесса (маркеры апоптоза, воспаления, метаболиты органических и неорганических веществ) или оценки текущего физиологического состояния человека. Эти методы часто не дают объяснения причин развития патологий и не оставляют возможности для своевременного назначения терапии или ее коррекции. Комплексная оценка иммуногенетических, физиологических и биохимических параметров организма позволяет решить эти вопросы, а также открывает новые возможности в области профилактики и прогнозирования риска развития патологий.

В данном контексте наиболее актуальной представляется характеристика индивидуальной реакции человека на факторы, оказывающие комплексное действие на защитный и восстановительный потенциал организма, и обуславливающие отсроченные клинические эффекты, прогнозирование которых поможет предотвратить их развитие. К данному типу воздействий относится, в частности, такой важный с медицинской точки зрения фактор, как радиация.

Установлено, что реакция организма человека на радиационное воздействие варьирует в широком диапазоне проявлений и носит индивидуальный характер. В первую очередь это связано с полиморфизмом генов, контролирующих процессы восстановления организма после облучения, а также с индивидуальными иммунофизиологическими факторами, регулирующими иммунный ответ. Иммунная система, ответственная за поддержание генетического гомеостаза организма, противоинфекционную и противоопухолевую защиту, является наиболее чувствительной к действию радиационного фактора. Это во многом определяет развитие ранних и отдаленных эффектов облучения. Таким образом, изучение наследуемых и функциональных особенностей иммунитета, ассоциированных с индивидуальной реакцией организма человека на радиационное воздействие, является актуальной задачей, требующей решения.

Сотрудниками ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, совместно со специалистами Уральского научно-практического центра радиационной медицины ФМБА России было проведено генетическое обследование хронически облученных лиц и впервые установлена связь ряда генов системы репарации ДНК и иммунного ответа (гены системы NLA) с состоянием здоровья обследованных лиц в отдаленном периоде. В настоящее время область применения разработанных методов расширена за счет иммуногенетической и иммунофизиологической характеристики краткосрочных эффектов облучения диапазона терапевтических доз, включающей функциональную оценку иммунного ответа в части распознавания антигена и реализации эффекторного звена иммунитета у пациентов, проходящих курс радиотерапии.

В ходе исследования создано более 50 оригинальных тест-систем для диагностики генетических маркеров и оценки цитокинового профиля, разработано программное обеспечение, позволяющее проводить качественный и количественный анализ исследованных параметров, проведено обследование более 1000 человек. Продолжение исследований в рамках НИР и НИОКР позволит создать отечественную аппаратно-диагностическую базу для проведения генетических исследований в области медицины, а также разработать технологию прогнозного иммунологического профилирования на основе индивидуального генетического обследования. Полученные данные и разработанные методы могут быть использованы в целях проведения профотбора при формировании контингентов, работающих в условиях повышенного риска радиационного воздействия и при генетическом консультировании лиц, задействованных в атомной промышленности, а также в профильных медицинских учреждениях для оценки риска развития осложнений терапевтического радиационного воздействия.

S01-33**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА ХЛАМИДИЙ ПП-87 ПО АССАМБЛЕЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО И ТЕПЛООВОГО ШОКА**

Каримов М.З. 1, Бакиров И.Х. 1 Вафин Р.Р. 1, Равилов Р.Х. 1, Тюлькин С.В. 2, Кабилов М.Р. 3, Зайнуллин Л.И. 4, Ахметов Т.М. 1

1Казанская государственная академия ветеринарной медицины

имени Н.Э. Баумана», Казань, Россия

2Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория, Казань, Россия

3ЦПК «Геномика» СО РАН, Новосибирск, Россия

4Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Геномы хламидий являются перспективным объектом исследования, а генетический критерий идентификации служит одной из конструктивных звеньев построения их таксономической классификации.

Технология высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS), приобретающая статус рутинных генодиагностических исследований, является необходимым инструментом полногеномного анализа, способствующим в т.ч. раскрытию молекулярных механизмов патогенеза изучаемого инфекционного агента.

Целью настоящей работы являлась молекулярно-генетическая характеристика штамма хламидий ПП-87, выделенного от абортировавшей самки песца, по ассамблее генов, кодирующих белки холодового и теплового шока, близлежащих к proS, на основе анализа полученных массивов данных высокопроизводительного секвенирования.

Секвенирование фрагментной библиотеки, выполненной с помощью набора NEBNext DNA Library (NEB, США), проводилось на геномном секвенаторе MiSeq (Illumina, США) по протоколу производителя с использованием набора MiSeq Reagent Kit, 600 Cycles (Illumina, США) в ЦПК «Геномика» СО РАН (Новосибирск).

В результате анализа полученных массивов данных высокопроизводительного секвенирования установлено, что, несмотря на общегеномное сходство штамма Chlamydia sp. ПП-87 к референсному геному штамма Chlamydia psittaci GR9 (GenBank A/N: CP003791), по ассамблее генов, кодирующих белки холодового (vacB and RNase II 3/-5/ exoribonucleases family protein) и теплового (dnaK, grpE, hrcA) шока, близлежащих к proS (prolyl-tRNA synthetase), он проявляет наиболее близкородственное сходство к штамму Chlamydia abortus S26/3 (GenBank A/N: CR848038).

Проанализированные гены штамма Chlamydia sp. ПП-87, кодирующие белки холодового и теплового шока, proS, а также другие близлежащие к ним гены с выраженным сходством к штамму Chlamydia abortus S26/3, кодирующие ABC transporter substrate binding family protein, LL-diaminopimelate aminotransferase и solute symporter family protein, являются ключом к раскрытию молекулярных механизмов развития инфекционного процесса с обоснованием патогенеза хламидийной инфекции, ассоциированной с колонизацией плаценты хозяина внутриклеточным паразитом.

S02-01**NOVEL ASPECTS OF HUMAN TELOMERASE RNA GENE EXPRESSION**

Maria Rubtsova¹, Yulia Naraykina¹, Daria Vasilkova¹, Sergey Kovalchuk², Vadim Govorun², Olga Dontsova¹

¹*Lomonosov Moscow State University*, ²*FSBIS SRI PCM FMBA of Russia*

Telomerase is a major participant in telomere homeostasis within eukaryotic cells. It is active in a number of cell types: stem, germ, embryonic and cancer cells. The majority of somatic cells doesn't retain active telomerase, and its reactivation drives cancer transformation. Expression of telomerase reverse transcriptase is tightly regulated in cells, but the telomerase RNA component expresses constitutively. It was postulated that TR is long non-coding RNA (lncRNA). It is transcribed by RNA-polymerase II as a precursor that matures to the 451 nt catalytically active RNA. It is known that many lncRNAs contains open reading frames (ORFs) and could be translated for their functionality.

We analyzed hTR gene sequence and found out that premature form of hTR contains an open reading frame that was named hTERP (human Telomerase RNA Protein). The homologous ORFs were found encoded by telomerase RNA of the other species. There amino acid sequences are homologous for 27,7% with variations in RNA sequences. Evidences of hTR translation would be discussed.

We speculate that translation of hTR may be essential for hTR maturation, such as tertiary structure folding or processing. Alternatively the protein itself may have some special function in telomere maintenance or elsewhere.

S02-02**THE SPATIAL ORGANIZATION OF EUKARYOTIC GENOME**

Ekaterina S. Gushchanskaya^{1,2,3}, Artem V. Artemov^{4,5}, Sergey V. Ulyanov¹, Maria D. Logacheva^{5,6},
Aleksey A. Penin^{5,6}, Olga V. Iarovaia^{1,3}, Alexey A. Gavrilov^{1,3}, Sergey V. Razin^{1,2,3}

¹ *Institute of Gene Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334, Russia*

² *Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

³ *LIA 1066 French-Russian Joint Cancer Research Laboratory, Villejuif, 94800, France– Moscow, 119334, Russia*

⁴ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

⁵ *Institute for Information Transmission Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow, 127994, Russia*

⁶ *Laboratory of evolutionary genomics, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

Although it is well established that eukaryotic genome possesses a complex spatial organization within the nuclear space, the factors that govern this organization remain obscure. Here we present the data demonstrating that clustering of CpG islands constitutes an important determinant of the 3D organization of interphase chromosomes. We used the 4C-Seq technique to characterize the genome-wide patterns of spatial contacts of the CpG island harboring promoter of house-keeping gene NPRL3 and several CpG islands located on chromosome 14 in cultured chicken lymphoid and erythroid cells. We observed a clear tendency for the interaction of CpG islands present on the same and different chromosomes. Accordingly, we observed preferential spatial contacts between the Sp1 binding motifs and other GC-rich genomic elements, including the DNA sequence motifs capable of forming G-quadruplexes. In contrast, an anchor placed in a gene/CpG island-poor area formed spatial contacts with other gene/CpG island-poor areas. These results suggest that the clustering of CpG islands that harbor promoters of house-keeping genes and origins of DNA replication direct spatial segregation of active and inactive parts of the genome.

S02-03

NEW ACTIVITIES OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1 AND ITS ROLE AS A KEY TARGET IN DESIGN OF ANTICANCER DRUGS

Olga I. Lavrik

***Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk State University,
 Novosibirsk, Russia***

Poly(ADP- ribose)polymerase 1 (PARP1) is one of the most abundant proteins in mammalian cells. PARP1 was discovered as DNA nick- sensor enzyme. Upon binding to DNA breaks, PARP1 catalyzes synthesis of Poly(ADP-ribose) and its covalent attachment to acceptor proteins and PARP1 itself. Poly(ADP-riboseylation) contributes to DNA repair and to the maintenance of genomic stability. We have discovered PARP1 interaction and poly(ADP-riboseylation) upon PARP1 binding to apurinic/apyrimidinic (AP) sites. AP sites are considered to be common lesions in genomic DNA. If unrepaired, AP sites present mutagenic consequences to the cell. The capacity of human PARP1 to interact with the intact AP sites was demonstrated and the specificity of PARP1 interaction was confirmed by the mutual tests. PARP1 interacting with AP sites catalyzes DNA strand incision by its internal AP lyase activity and demonstrates also 5'dRP lyase activity. The interaction of PARP1 with AP sites modulates activity of enzymes which catalyze the AP-site cleavage such as apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1). The activity of this enzyme was influenced by PARP1 in the process of cleavage of DNA containing single or clustered AP sites. The capacity of the other enzyme, human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1), to the AP site cleavage was detected by us. PARP1 stimulates activity of Tdp1 in the AP site cleavage. The protein–protein interactions of PARP1 with APE1 and Tdp1 were detected by various techniques. These interactions were suggested as a basis of modulation of APE1 and Tdp1 activities by PARP1 in the AP site processing. The contribution of PARP1 to regulation of nucleotide excision repair (NER) was observed by us recently. Poly(ADP-riboseylation) of XPC-Rad23B, XPA and RPA was shown as a key mechanism in regulation of NER. Due to central role of PARP1 in DNA damage signaling and regulation of DNA repair, PARP1 is regarding as a promising target for design of PARP inhibitors as anticancer agents.

This work was supported by the RFBR (13-04-40197-comfi and 14-04-00268), by grant RSCF 14-24-00038, by the Program of RAS on Molecular and Cellular Biology, by state contract 14.604.21.0018.

S02-04**DARK MATTER RNA IN GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES**Y. Vyatkin^{1,2*}, G. St.Laurent^{1,3}, D. Shtokalo^{1,2,4}, D. Antonets⁵, P. Kapranov¹¹ *St. Laurent Institute, 317 New Boston St., Suite 201, Woburn MA 01801 USA*² *AcademGene LLC, Novosibirsk 630090, Russia*³ *Brown University, Providence, RI, 02912, USA*⁴ *A.P.Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk 630090, Russia*⁵ *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk, Koltsovo 630559, Russia*

*** Corresponding author Vyatkin Yuri Viktorovich, e-mail: yuri@nprog.ru, tel.: +7-913-922-0914, fax: +7(383)332-1676**

In the past decade, numerous studies have made connections between sequence variants in human genomes and predisposition to complex diseases. However, most of these variants lie outside of the charted regions of the human genome whose function we understand. Consequently, the general concept of a mechanism that translates these variants into predisposition to diseases has been lacking, potentially calling into question the validity of these studies. Here we make a connection between the growing class of apparently functional RNAs that do not encode proteins and whose function we do not yet understand (the so-called 'dark matter' RNAs) and the disease-associated variants. We investigated statistical association between different classes of genomic elements, such as exons of protein coding mRNAs, their regulatory regions and different classes of ncRNAs and the disease-associated variants.

Strikingly, discovery of GWAS variants seem to favor different genomic elements depending on disease type. Only two disease types showed a preference for discovery of GWAS variants in coding regions of known genes: metabolic diseases and anatomical diseases. By contrast, diseases affecting mental health favored annotated lncRNAs (lincRNAs and vlincRNAs), while cellular proliferation diseases favored introns of protein-coding genes. The even distribution in the non-disease trait category (which includes a large number of different phenotypes) provides a perspective for the contrasting results in the disease categories.

Sequencing of total RNA from normal and tumor tissues recently uncovered a novel class of lncRNAs, vlincRNAs, showed statistically significant associations with GWAS variants. Thousands of these vlincRNAs span at least 10% of the human genome, and probably much more, once additional tissues are profiled. These RNAs range from 40 kb up to around 1 MB in length, and are controlled by typical RNA Pol II promoters. An intriguing subset of these RNAs – those controlled by promoters within endogenous retroviral elements – characterizes cancerous and pluripotent states. Widespread presence of such very long RNAs suggests that vlincRNAs represent a global property of the human genome.

S02-05

AMICOUMACIN: A NEW ANTIBIOTIC TARGETING RIBOSOME

Ilya A. Osterman¹, Yuri S. Polikanov², Olga V. Efremenkova³, Tatyana A. Efimenko³, Irina A. Malanicheva³, Marina V. Serebryakova¹, Andrey L. Konevega⁴, David Bulkley⁵, Pavel Kusocheh¹, Vadim N. Tashlitsky¹, Karen J. Shaw⁶, Teresa Szal⁷, Marina V. Rodnina⁸, Alexey A. Bogdanov¹, Olga A. Dontsova¹, Alexander S. Mankin⁷, Thomas A. Steitz², Petr V. Sergiev¹
¹*Lomonosov Moscow State University, Russia*, ²*Yale University, USA*, ³*G. F. Gauze Institute of New Antibiotics, Russia*, ⁴*B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Russia*, ⁵*Present address: University of California at San Francisco, USA*, ⁶*Hearts Consulting Group, USA*, ⁷*University of Illinois at Chicago, USA*, ⁸*Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Germany*

Despite the discovery of the antibiotic amicoumacin A decades ago, very little is known about cellular target and mechanism of its action. In this work we demonstrate that AMI is a potent inhibitor of protein synthesis and uncovered its binding site on the ribosome and an unexpected mechanism of action. Resistance mutations in helix 24 of the 16S rRNA mapped the amicoumacin A binding site to the small ribosomal subunit. The crystal structure of bacterial ribosome in complex with amicoumacin A solved at 2.4 Å resolution revealed that antibiotic interacts with universally conserved nucleotides of 16S rRNA in the E site and the backbone of the mRNA. The observed binding mode of amicoumacin A suggests that it locks mRNA in its channel and thereby inhibits translocation. Consistently, biochemical testing showed that binding of amicoumacin A prevented translocation of the ribosome from the mRNA initiator codon. Non-ribosomal resistance mutations were identified in the translation elongation factor G which catalyzes translocation. Altogether, the results reveal a novel binding to the ribosome of previously unknown protein synthesis inhibitor and a new mode of inhibition of translation.

S02-06**HIGH THROUGHPUT SCREENING OF THE 5'-UTRS - NEW EFFICIENT RIBOSOME BINDING SITES****Osterman Ilya¹, Evfratov Sergey¹, Andreyanova Ekaterina¹, Rubtsova Maria¹, Kostryukova Ekaterina², Govorun Vadim², Sergiev Petr¹, Bogdanov Alexey¹, Dontsova Olga¹****¹Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia, ²Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow, Russia**

Regulation of gene expression at the level of translation accounts for up to three orders of magnitude in its efficiency. Previously, we systematically compared the impact of several known mRNA ribosome binding site (RBS) features, such as length and location of the Shine Dalgarno sequence (SD), secondary structure, start codon etc, on translation initiation; the experiments were done in a system with internal control based on dual cerulean and red (CER/RFP) fluorescent proteins. Based on these results, we proposed a model for estimating translation efficiency and predict translation efficiency for large set of natural 5'-UTRs. Among a set of 50 natural 5'-UTRs cloned into the CER/RFP reporter system we've found several outliers that possesses much worse or much better translation efficiencies than could be predicted. Consequently, we concluded that known elements composing bacterial RBS are non sufficient to adequately describe translation efficiency. We chose a set of outlier 5'-UTRs to investigate what makes them different from those whose ribosome binding efficiency was successfully predicted. Selected 5'-UTRs were randomly mutated within the reporter plasmid and E. coli cells transformed with this library were sorted according to the ratio of the CER and RFP fluorescence, subjected to next generation sequencing (NGS) and analysis. Several unexpected features which strongly affect bacterial translation were found. To investigate mRNA RBS elements contributing to translation efficiency further we created an unbiased set of reporter construct libraries exceeding a million randomized RBS variants. After sorting and NGS we not only investigated a detailed anatomy of classic bacterial RBS, but also found several completely unusual sequences, which provide strong translation efficiency.

S02-07

СТРЕССОВЫЙ ОТВЕТ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*: АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ ИЛИ ИСПОРЧЕННЫЕ ТОРМОЗА

Фисунов Г.Ю., Мазин П.В., Горбачёв А.Ю., Алтухов И.А., Семашко Т.А., Алексеев Д.Г., Говорун В.М.

ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России

Бактерии класса Молликут являются удобными модельными объектами для системных исследований в силу редукции генома и простоты организации всех клеточных систем. *Mycoplasma gallisepticum* вызывает хроническое респираторное заболевание птиц и является близким родственником микоплазм, патогенных для человека: *M.pneumoniae* и *M. genitalium*. Отсутствие патогенности для человека делает *M. gallisepticum* удобным лабораторным объектом для системных исследований по сравнению с другими микоплазмами.

В настоящей работе мы провели картирование транскрипционных единиц в геноме *M. gallisepticum* включая промоторы, опероны и терминаторы, а также сайтов связывания рибосомы. Мы исследовали транскрипционный ответ *M. gallisepticum* на тепловой, гиперосмотический и окислительный стресс, а также изменения профиля транскрипции в процессе роста культуры. Также мы детально исследовали процесс трансляции в логарифмической фазе роста и в условиях теплового стресса.

В результате мы идентифицировали 1061 промотор с 10% FDR. Мы обнаружили, что основным элементом промотора *M. gallisepticum* является ТАТА-бокс с последовательностью ТААААТ, расположенный на расстоянии 5-7 нт. от сайта инициации транскрипции и окружённый АТ-богатыми последовательностями. Ряд сильных промоторов имеет также Ext-элемент с последовательностью TRTG, расположенный на расстоянии 1 нт перед ТАТА-боксом. Другой консервативный элемент промотора – 35-бокс почти не представлен в промоторах *M. gallisepticum*. Транскрипция у *M. gallisepticum* почти всегда начинается с пурина (A/G).

Мы идентифицировали два типа терминаторов транскрипции в геноме *M. gallisepticum*. Один тип представляет собой внутренние терминаторы со шпильчатой структурой. Другой тип не имеет выраженной шпильчатой структуры.

Также мы провели поиск мотивов в 5'-UTR транскриптов *M. gallisepticum*, а также моделирование взаимодействие между 5'-UTR и 3'-концевой последовательностью 16S рРНК. В результате обнаружили, что наиболее полным сайтом связывания рибосомы является последовательность GAAAGGAGG, однако обычно сайт связывания рибосомы составляет 4-5 букв из этой последовательности. Спейсер между старт-кодоном и сайтом связывания рибосомы составляет порядка 8-13 нт.

Мы обнаружили, что в тепловом стрессе, в отличие от других типов стресса, происходит системное изменение профиля транскрипции (порядка 400 генов изменяют уровень транскрипции). Это послужило причиной более детального изучения ответа на тепловой стресс. Мы обнаружили, что регуляция ответа на тепловой стресс может быть объяснена без привлечения транскрипционных факторов, обнаружить которые так и не удалось. В частности, изменение уровня транскрипции обуславливается строением промотора - последовательностью ТАТА-бокса, АТ-составом его окружения и иницирующим нуклеотидом. Также в тепловом стрессе происходит множественная активация критических промоторов. Мы обнаружили, что кроме промоторов терминаторы также вносят вклад в ответ на тепловой стресс. Так, обнаруженные нами бесшпильчатые терминаторы в тепловом стрессе могут отклоняться, что приводит к увеличению транскрипции генов, стоящих после таких терминаторов.

Хотя тепловой стресс приводит к значительным изменениям в профиле тотальной мРНК, на уровне протеома эти изменения практически не проявляются. Единственный значимо возрастающий белок – шаперон ClpB. Мы исследовали изменения в рибосомально-связанной фракции мРНК при

Section 2: Methods of analysis of the transcriptional activity of coding and noncoding parts of the genome

тепловом стрессе. В результате установили, что изменения на уровне тотальной мРНК почти не отражаются на пуле рибосомально-связанной мРНК. Единственным сильным изменением является увеличение представленности мРНК *clpB*, что согласуется с протеомными данными.

Таким образом, глобальное изменение транскрипционно профиля *M. gallisepticum* в тепловом стрессе носит, по-видимому, «шумовой» характер. Вопрос об адаптивности таких изменений является открытым. Отдельного внимания заслуживает механизм «фильтрации» транскриптов на уровне связывания с рибосомой, который препятствует трансляции «шумовых» транскриптов.

S02-08

IDENTIFICATION OF SMALL OPEN READING FRAME (SORF) IN GENOME OF THE MOSS *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Fesenko I.A.¹, Arapidi G.P.^{1,2}, Khazigaleeva R.A.¹, Babalyan K.A.², Zakiev E.R.², Kostrukova E.S.³, Kovalchuk S.I.^{1,3}, Anikanov N.A.¹, Semashko T.A.³, Govorun V.M.^{1,3}, Ivanov V.T.¹

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;* ²*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Russia;* ³*Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia.*

Small open reading frames (sORFs, up to 100 codons) have the potential to encode biologically active peptides that have regulatory roles in eukaryotic cells. The aim of our work was to identify of the sORF in genome of model plant – *P.patens* moss. To identify sORF that coding peptides, high-throughput RNA-Seq by SOLiD 4 genetic analyzer (Life Technologies, Applied Biosystems) and identification of native peptides by TripleTOF 5600 LC-MS/MS (ABSciex) has been carried out on gametophore, protonema and protoplast cells of moss *Physcomitrella patens*. Optimal procedure for endogenous peptide extraction and identification has been worked out to demonstrate translation of sORFs.

Using sORFinder, we distinguished 241,228 sORFs within intergenic region with high coding potential. RNA-Seq confirmed transcription of 8,450 sORFs from intergenic region. Tandem mass-spectrometry analysis resulted in identification of 44 peptides derived from 27 sORFs within intergenic region, 52 peptides derived from 42 sORFs that were previously thought to be untranslated region of mRNAs and more than 100 peptides from about 100 alternative sORFs within previously known ORFs. Comparative analyses of sORFs sequences distinguished in moss *Physcomitrella patens* with genomes of other plant species revealed high conservation in terms of synonymous/nonsynonymous substitutions.

S02-09**ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОРОТКИХ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ (SORF) В ГЕНОМЕ МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS***

Фесенко И.А.¹, Арапиди Г.П.^{1,2}, Хазигалеева Р.А.¹, Бабалян К.А.^{1,2}, Закиев Э.Р.^{1,2}, Кострюкова Е.С.^{2,3}, Ковальчук С.И.^{1,2}, Аниканов Н.А.¹, Семашко Т.А.¹, Говорун В.М.^{1,2}, Иванов В.Т.¹

¹*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия;* ²*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия;* ³*Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

Короткие рамки считывания (до 100 кодонов) могут кодировать биоактивные пептиды, обладающие регуляторными функциями в эукариотических клетках. Целью нашей работы являлась идентификация таких коротких рамок считывания, в геноме модельного объекта – мох *Physcomitrella patens*. Для проверки кодирующего потенциала идентифицированных рамок мы выполнили транскрипционное профилирование и анализ пула нативных пептидов трех типов клеток мха – гаметофоров, протонемы и протопластов.

Для поиска коротких рамок в геноме мха мы использовали программу sORFfinder, с помощью которой в межгенных участках было идентифицировано 241,228 коротких рамок считывания, обладающих высоким кодирующим потенциалом. С помощью транскрипционного профилирования мы подтвердили транскрипцию 8,450 коротких рамок считывания. Проанализировав данные масс-спектрометрического анализа пула нативных пептидов мы идентифицировали 44 пептида, относящиеся к 27 коротким рамкам. Кроме того, мы идентифицировали 52 пептида, относящиеся к 42 рамкам считывания в нетранслируемых участках известных генов. А также более 100 пептидов из примерно 100 альтернативных рамок считывания, расположенных внутри известных генов. Сравнительный анализ коротких рамок считывания идентифицированных у мха с геномами других растений подтвердил высокую консервативность данных участков на основе анализа синонимичных/несинонимичных замен.

S02-10

WHOLE GENOME ANALYSIS OF CONNECTION BETWEEN A-TO-I RNA EDITING AND SPLICING IN *DROSOPHILA*

D. Shtokalo^{1,2,3*}, G. St.Laurent^{1,4}, M. Tackett¹, S. Nechkin^{1,2,3}, D. Antonets⁵, Y. Vyatkin^{1,3}, Y. Savva⁴, P. Kapranov¹, C. Lawrence⁴, R. Reenan⁴

¹ St. Laurent Institute, 317 New Boston St., Suite 201, Woburn MA 01801 USA

² A.P.Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk 630090, Russia

³ AcademGene LLC, Novosibirsk 630090, Russia

⁴ Brown University, Providence, RI, 02912, USA

⁵ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk, Koltsovo 630559, Russia

* Corresponding author ShtokaloDmitryNikolaevich, e-mail: dmitry@nprog.ru, tel.: +7(383)332-1676, fax: +7(383)332-1676

RNA editing and splicing are important mechanisms of post-transcriptional modification of RNA sequence. RNA modification events regulate expression of genes and increase gene products diversity. Editing mediated by ADAR enzymes (adenosine deaminases that act on RNA) is one of the most common editing mechanisms in eukaryotes. Detection of authentic Adenosine-to-Inosine RNA editing events produced by ADAR and study of splicing regulation represent important problems in molecular biology.

In previous work we have identified 3581 sites of ADAR editing in *Drosophila* with at least 75% validation rate using Sanger sequencing. The high quality list was the result of a robust pipeline based on a combination of single-molecule sequencing (SMS), exhaustive validation component, and application of machine learning methods. Comprehensive number of sites allowed us to draw general conclusions about the biological properties and functions of RNA editing in *Drosophila*. We showed that most editing occurs in non-coding portions of the transcriptome. Sites within mRNAs showed a 5' to 3' bias and were significantly enriched for non-synonymous recoding events in highly conserved regions. Sites of ADAR modification exhibited minor sequence motif conservation and had a tendency to cluster within transcripts. Finally, we provided evidence that editing globally regulates expression levels of edited mRNAs and that presence of RNA editing is strongly positively correlated with alternative splicing.

In this work we present additional 4096 sites based on Random Forest machine learning approach that distinguish authentic sites in SMS data from technical and biological noise. The resulting list of 7677 sites confirms previous conclusions. Additionally, we observe significantly higher editing activity in introns involved in splicing differentially between wild type fly and mutant with ADAR gene knocked down. Computational analysis of RNA secondary structure confirms concentration of editing sites complementary sequences around sites.

S02-11**НАСЛЕДУЕМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК В КЛЕТКАХ HELa ПРИ ДЕЙСТВИИ ГАММА-КВАНТОВ И МИТОМИЦИНА C**

Матишов Дмитрий Геннадьевич, Шин Евгения Федоровна, Тимошкина Наталья Николаевна, Бойко Николай Валерьевич, Махоткин Михаил Александрович, Тарасов Валентин Алексеевич

Институт аридных зон Южного научного центра РАН, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В клетках HeLa исследовалась aberrантная экспрессия микроРНК после индукции межнитевых сшивок и разрывов ДНК. В качестве индуктора повреждения ДНК использовались гамма-кванты Co60 в дозе 2,5 Гр и митомицин C в концентрации 5 мкг/мл среды. Содержание микроРНК в клетках оценивалось с помощью метода параллельного множественного секвенирования кДНК-копий микроРНК на платформе MiSeqSystem. Учитывались микроРНК, концентрация которых отличалась от таковой в опытных вариантах не менее, чем в 1,5 раза по сравнению с интактными клетками с уровнем значимости менее 0,001. Оказалось, что при облучении в 11 из 380 микроРНК, включенных в анализ, значительно меняется уровень экспрессии. Причем для 8 микроРНК эти изменения экспрессии наблюдаются не только в первом после радиационного воздействия клеточном цикле, но и в клетках-потомках спустя 5-6 клеточных делений. Аналогичные показатели для митомицина C составляют значения 25 и 21 микроРНК, соответственно.

Полученные нами сведения являются ещё одним свидетельством того, что при оценке отдаленных генетических последствий ионизирующей радиации и химических соединений следует учитывать эффекты, связанные не только с генными мутациями и хромосомными aberrациями, но и индуцированные эпигенетическими изменениями генома, обусловленными aberrантной наследуемой экспрессией микроРНК.

S02-12**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЛИНЫ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ
BACILLUS PUMILUS 3-19****Митрофанова О. С., Тойменцева А. А., Шарипова М. Р.****Россия г. Казань Казанский (Приволжский) Федеральный Университет**

Интерес к протеиназам бацилл объясняется их высокой активностью и широтой практического применения в промышленности и медицине. Практическая ценность протеаз указывает на необходимость получения высокоэффективных продуцентов этих ферментов. Существуют разные способы повышения продуктивности бактериальных культур. Одним из подходов является направленное изменение экспрессии гена (например, мутационный анализ). Экспрессия гена, главным образом, зависит от транскрипции, где основным элементом является промотор гена. В зависимости от структуры промотора и его длины, генная экспрессия может значительно отличаться. Объектом настоящего исследования являются протеолитические ферменты – субтилизиноподобная протеиназа (ArgPr) и глутамилэндопептидаза (GsePr) *B. pumilus* 3-19. Для определения длины промоторов генов протеиназ и количественного анализа экспрессии использовали векторы pAC6 и pGFPamyE, содержащие репортерные гены *lacZ* и *gfp* соответственно. Тестировали потенциальные промоторные области гена *aprPr* длиной 360, 300, 270, 240, 200, 150, 100, 50 п.о. и гена *gsePr* длиной 200, 150, 100, 50 п.о. Репортерные конструкции секвенировали и трансформировали в клетки *B. subtilis* 168. Предварительные данные, полученные на основе активности бета-галактозидазы и флуоресцентного белка, показали, что для экспрессии исследуемых генов промотор *aprPr* должен составлять не менее 300 п.о., а промотор *gsePr* – 150 п.о. Количественное определение экспрессии будет проведено методом выделения тотальной РНК из рекомбинантных клеток, дальнейшего получения кДНК и постановки ПЦР в реальном времени. Полученные результаты позволят сделать вывод о зависимости экспрессии генов от длины их регуляторной области.

S02-13**ЭКСПРЕССИЯ АДРЕНО- И ХОЛИНЭРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ В СВЯЗИ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПРОЦЕССОМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

Елшин Н.Д., Чухловин А.Б., Кузубова Н.А., Титова О.Н.

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, НИИ пульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

До настоящего времени патогенез хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) изучен недостаточно. Поэтому представляется важным исследование активности генов, кодирующих ферменты коллагенолиза (*MMP1*), генов протеаз, регулирующих сосудистые реакции в генезе ХОБЛ, в частности ангиотензин-конвертирующего фермента (ген *ACE-1*). Поскольку в процессе лечения ХОБЛ применяются препараты М-холинолитиков и агонисты бета-2-адренорецепторов, то целесообразно определить прогностическую значимость экспрессии генов адрено- и холинорецепторов (*ADRB2*, *CHRM3*).

В ходе предварительных исследований нами были обследованы 23 больных с ХОБЛ, поступивших для лечения по причине сезонных обострений заболевания. Основные показатели дыхательной функции, а также параметры периферической крови и маркеры системного воспаления определяли до и после курса терапии. Из лейкоцитов крови пациентов выделяли РНК, на её основе синтезировали кДНК, которая являлась матрицей для ПЦР в реальном времени для количественной оценки уровней экспрессии вышеперечисленных генов, посредством ПЦР в реальном режиме времени. Нормализация данных проводилась по гену *GAPDH*.

Нами выявлена достоверная корреляция между экспрессией трех изученных генов: *COX2*, *ADRB2* и *CHRM3*. Это свидетельствует об однонаправленной регуляции активности этих генов в лейкоцитах больных ХОБЛ. Экспрессия *COX2* в лейкоцитах после курса лечения не изменяется у больных с легкой формой ХОБЛ, но существенно возрастает ($r=0.74$; $n=18$; $p=0.0002$) при лечении пациентов с более выраженной симптоматикой (2 и более обострений в год).

Показана также зависимость между повышением экспрессии гена м-холинорецептора (*CHRM3*) и возрастанием важного показателя ОФВ1 в процессе терапии. Достоверная корреляция обнаружена также между экспрессией *CHRM3* и повышением С-реактивного белка в сыворотке крови.

Следует отметить, что после курса бронхолитического лечения отмечены достоверные корреляции между изменениями уровней С-реактивного белка в сыворотке крови и экспрессией гена *ADRB* ($r=0.59$, $p=0.013$), а также с активностью *COX2*, ($r=0.61$; $n=14$; $p=0.01$) в лейкоцитах.

Таким образом, уровни экспрессии ряда фармакогенов связаны как между собой, так и с изменениями клинических показателей и традиционных биомаркеров, отражающих тяжесть ХОБЛ и эффективность его лечения.

S02-14**CONFORMATIONAL CHANGES OF EUKARYOTIC POLYRIBOSOMES DURING LONG TRANSLATION IN CELL-FREE SYSTEM AS IT SHOWN BY CRYO ELECTRON TOMOGRAPHY**

Alexander G. Myasnikov¹, Zhanna A. Afonina², Vladimir A. Shirokov², Bruno P. Klaholz¹, Alexander S. Spirin²

¹Centre for Integrative Biology (CBI), IGBMC (Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France., ²Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Using cryo electron tomography techniques, the eukaryotic polyribosomes formed in a long-term cell-free translation system based on wheat germ extract were analyzed over the time of their active translation life. Three distinct types of polyribosome conformations were observed in the translation mixture: (1) circular polyribosomes, varying from ring-shaped forms to circles collapsed into double-rows, (2) linear polyribosomes, tending to fold into planar zigzags, and (3) densely packed four-fold 3D helices. At the start the circular polyribosomes, along with the linear polyribosomes, were predominant, being in approximately equal proportions during the first rounds. Progressive loading of polyribosomes with translating ribosomes led to a significant variety in the occupancy of the polyribosomes by translating ribosomes, from 240 to 80 nucleotides per ribosome. The loading up to the occupancy of 60±20 nucleotides per ribosome resulted in abrupt transformation of polyribosomes into dense, highly ordered 3D helices. After 8-10 translation rounds the polyribosomes with the dense helical 3D conformation comprised up to half of the total polyribosome population. By the end of active translation phase this compact form of polyribosomes became predominant. Functional tests showed a reduced translational activity in the fraction of the 3D helical polyribosomes.

S02-15**ГЕНОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭКСПРЕССИОННЫЙ ОТВЕТ ИЗО-АСПАРТИЛ-МЕТИЛТРАСФЕРАЗ КРИПТОБИОТИЧЕСКОГО НАСЕКОМОГО****Р.М.Девятяров¹, М.Д.Логачева², Т.Кикавада³, О.А.Гусев¹****¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, ²Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия, ³Национальный Институт Агро-биологических Наук, Цукуба, Япония**

Белки L-изоаспартат-метилтрансферазы (PIMT) являются частью сложной системы, позволяющей личинкам хирономиды *Polypedilum vandeplanki* переносить полное высыхание. В ходе анализа генома насекомого выявлены значительные отличия в структуре и экспрессионной активности генов PIMT по сравнению с близкородственным *P.nubifer*. В геноме *P. vanderplanki* кроме широко распространенного ортолога PIMT имеется участок длиной около 30000 пн, где заключены 13 новых генов такой метилтрансферазы. С помощью секвенирования матричной РНК методом RNA-seq, а также анализом экспрессии генов с использованием микрочипов, был определен ответ генов PIMT на стрессовые факторы: высыхание, тепловой шок, радиоактивное облучение. Новые гены PIMT показывали повышение активности в 3-40 и 10-230 раз после 24 и 48 обезвоживания, соответственно, тогда как «классический» ген не изменял своей транскрипционной активности. Ответ данных генов на изученные стрессы имеет индивидуальный характер, что указывает на различную регуляцию и функциональную специализацию новых PIMT. Такие выводы подтверждаются результатами анализа субстратной специфичности рекомбинантных PIMT: только классический ген PIMT1, а также один из новых (PIMT2) способны метилировать L-изо форму аспарагиновой кислоты в составе пептида.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (код проекта: 12-08-33157мол_а_вед и 14-34-50128 мол_нр).

S02-16**АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ПОВРЕЖДЕННОЙ ПСОРИАЗОМ КОЖЕ****Золотаренко А.Д., Мезенцев А.В., Соболева А.Г., Брускин С.А.*****Федеральное бюджетное учреждение науки, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН***

Введение: Псориаз это иммуноопосредованное дерматологическое заболевание, при котором взаимодействие клеток иммунной системы и клеток кожи приводит к изменению внешнего облика кожных покровов. В работе обобщены результаты сравнительного анализа генной экспрессии в пораженной и незатронутой болезнью коже больных псориазом, с использованием биоинформационных подходов.

Целью нашего исследования было установить основные регуляторные факторы патогенеза заболевания и предложить для обсуждения молекулярный механизм развития патологических изменений в пораженной болезнью коже.

Методы: В работе использованы следующие методы: анализ экспрессионных биочипов, (84 индивидуальных образца), и высокопроизводительное секвенирование (15 пар образцов).

Результаты: Сравнительный анализ транскриптома выявил около 3000 генов с измененной экспрессией. Анализ полученных изменений показал, что патологические изменения при псориазе затрагивают сигнальные пути, вовлеченные в дифференцировку и пролиферацию эпидермальных кератиноцитов, биосинтез и секрецию антимикробных пептидов и эндогенных ингибиторов протеаз. Полученные результаты подтверждают повышенный уровень экспрессии провоспалительных цитокинов: IL12A, IL12B, IL17A, IL17F и TNF, которые играют активную роль в развитии иммунного ответа Th1-типа. Помимо этого, авторы описывают возможный молекулярный механизм, стоящий за развитием болезни, ключевым элементом которого является рецептор продуктов не ферментативного гликозилирования RAGE. Результаты проведенного анализа подтверждают предположения о существовании молекулярной сигнатуры псориаза, которая включает ~80 генов. Данные об изменениях экспрессии этих генов предлагается использовать при диагностике псориаза. Данный метод диагностики позволит отличать псориаз от других болезней с похожими внешними изменениями: Т-клеточной лимфомы, грибовидного микоза и др.

Заключение: В работе представлены данные об изменениях генной экспрессии в пораженной псориазом коже и описывается предполагаемый молекулярный механизм заболевания. Кроме этого, авторы предлагают метод диагностики псориаза, по изменениям генной экспрессии в коже больных.

S02-17**ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОК НАСАТ В КАЧЕСТВЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПСОРИАЗА****Соболева АГ, Золотаренко А.Д., Брускин С.А., Мезенцев А.В.*****Федеральное бюджетное учреждение науки, Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова РАН***

Введение: Использование клеточных культур в качестве экспериментальных моделей существенно упрощает исследования молекулярных основ патологических изменений заболеваний. Клетки HaCaT часто используют в качестве экспериментальной модели псориаза. В предлагаемой работе приводятся результаты сравнительного анализа генной экспрессии в клетках HaCaT обработанных провоспалительными цитокинами IFNG, IL17 и TNF и коже больных псориазом. Полученные результаты обработаны и проанализированы с использованием биоинформационных подходов.

Целью нашего исследования было сопоставить данные об изменении генной экспрессии в клетках HaCaT, обработанных провоспалительными цитокинами с аналогичными данными исследования образцов кожи больных псориазом.

Методы: В работе использованы данные анализа экспрессионных биочипов. Проанализированные образцы были получены из культур клеток (6 пар образцов) и кожи больных псориазом (4 пары образцов).

Результаты: Сравнительный анализ изменений генной экспрессии выявил группу из 8 генов (MCM2, MCM4, MCM5, FOXM1, ASF1B, KIF11, TPX2 и TK1), экспрессия которых повышена в пораженной псориазом коже, но при этом, снижена в клетках HaCaT, после их обработки цитокинами. Примечательно, что эти гены принимают непосредственное участие в репликации ДНК, т.е. объединены общей функцией. Помимо этого, нами показано, что обработка клеток HaCaT провоспалительными цитокинами приводит к снижению пролиферации клеток, в то время как, повышенный уровень тех же цитокинов является одной из основных причин гиперпролиферации эпидермальных кератиноцитов в коже больных псориазом. Авторы предполагают, что выявленные ими изменения генной экспрессии ответственны за снижения пролиферации клеток HaCaT после их обработки TNF, IFNG и IL17.

Заключение: Результаты работы свидетельствуют о том, что HaCaT имеет существенное ограничение в качестве модельной системы псориаза, так как обработка HaCaT провоспалительными цитокинами не приводит к увеличению пролиферации клеток. Эту особенность необходимо принимать во внимание при изучении влияния новых лекарственных препаратов на пролиферацию клеток кожи.

S03-01**SHOTGUN LIPIDOMICS FOR CELL BIOLOGY AND MOLECULAR MEDICINE****Andrej Shevchenko*****MPI of Molecular Cell Biology and Genetics, 01307 Dresden***

Lipidomics, an emerging branch of omics sciences, aims at quantitative characterization of the full lipid complement of cells, tissues or entire organisms. Shotgun lipidomics implies that total lipid extracts are directly infused into a tandem mass spectrometer and thousands of MS and MS/MS spectra are acquired in a single run. Individual molecular species are then recognized and quantified by their accurately determined intact masses that are optionally combined with the masses of structure-specific fragment ions.

Shotgun lipidomics is appealing: it is a rapid, comprehensive, robust and versatile analytical method that is compatible with almost any mass spectrometric platform. Continuous spray at the nanoflow rate provides ample time to achieve robust ion statistics even for minor lipid peaks, while ionization conditions can be tuned to enhance the sensitivity towards barely detectable lipid classes. There is no carry-over between samples and the entire process from lipid extraction to spectra interpretation and visualization of lipidome-wide compositional changes can be completely automated. Shotgun lipidomics is indispensable in both high-throughput clinical screens and in-depth characterization of individual molecular lipid species, including molecules from novel lipid classes isolated from a variety of model organisms from bacteria to men. Within less than 5 min, a typical shotgun experiment quantifies 200+ species from more than 15 major lipid classes from as low as 5 nmols of total lipids material. Here we demonstrate that high resolution tandem mass spectrometers together with the dedicated data interpretation software LipidXplorer support a broad scope of research efforts in cell biology, molecular medicine and nutrition science.

S03-02**TRENDS IN STRUCTURAL COVERAGE OF THE PROTEIN UNIVERSE****Kamil Khafizov¹, Carlos Madrid-Aliste², Steven C Almo³, Andras Fiser²****¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russia, ²Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA, ³New York Structural Genomics Research Consortium, Bronx, NY, USA**

The exponential growth of protein sequence data provides an ever-expanding body of unannotated and misannotated proteins. The worldwide structural genomics efforts facilitate functional annotation of proteins through their structural characterization. Recently there have been profound changes in the taxonomic composition of sequence databases, which are effectively redefining the scope and contribution of the large-scale structure based efforts. Despite the enormous increase in the number of sequences, the overall structural coverage of proteins, including proteins for which reliable homology models can be generated, on the residue level has increased from 30% to 40% over the last 10 years. Structural genomics efforts contributed 50% of this new structural coverage, despite determining only 10% of all new structures. These and other major highlights from the analysis of protein sequence and structure databases will be presented.

S03-03**CHROMOSOME-CENTRIC QUANTITATIVE PROTEOME AND TRANSCRIPTOME****Victor Zgoda, Arthur Kopylov, Natalia Moskaleva, Olga Tikhonova, Alexander Moisa, Tatyana Farafonova, Svetlana Novikova, Andrey Lisitsa and Alexander Archakov*****Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences, Russia***

The current stage of C-HPP is focused on constructing the chromosome-centric proteomic catalogues. Selected reaction monitoring (SRM) is recommended for C-HPP as the method for targeted protein detection and quantification in complex samples due to its high sensitivity at the level of several protein copies per cell. Using SRM, the fragment ion traces for 276 proteins were assayed by SRM in depleted plasma, liver and HepG2 cells. Summarized SRM results for all types of biomaterial comprise 269 detected proteins, including data on 164 proteins in plasma, 171 in the HepG2 cell line, and 186 in liver tissue. For 7 proteins we observed none or poorly reproduced SRM signals. In total the detected proteins cover 95% of protein-coding genes of Chr 18.

Concentration of 164 proteins encoded by Chr 18 was measured by SRM with stable isotope peptides as internal standards. Plasma samples of 10 astronaut candidates were used to evaluate inter-individual variance of the plasma protein concentrations. For 54 of 164 detected proteins the variance between samples did not exceed 30% of averaged concentrations. At the same time liver samples were characterized much higher level of inter-individual variation.

Analysis of protein distribution in tissues demonstrated that a significant portion of detected proteins (51%) was observed both in human plasma and liver tissue. There were also proteins featured for plasma only (33%) or exclusively observed in the liver (16%).

In addition, the transcriptome profiling for liver tissue and HepG2 cells was performed using two RNAseq platforms (SOLiD and Illumina), and also by Droplet Digital PCR (ddPCR) and quantitative RT-PCR. In summary, for liver tissue and HepG2 cells a «transcriptoproteome» was produced which reflects the relationship between transcript and protein copy numbers of the genes on Chr 18.

S03-04**STUDY OF UBIQUITIN-MODIFIED SUB-PROTEOME IN MOUSE LIVER****A.S. Zhabereva¹, E.L. Guryev¹, E.V. Kondratieva¹, A.T. Kopylov², V.G. Zgoda², M.R. Gainullin¹****¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia, ²Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia**

Ubiquitylation, a posttranslational modification of proteins, regulates a multitude of critical cellular processes. Ubiquitylation results from the covalent linkage of the polypeptide ubiquitin (Ub) to a lysine on the target protein. Ub can be attached either as a monomer or in a form of multi-Ub chains. Here we examined some proteomic workflows aimed to discovery of Ub-modified subproteome. Experiments were carried out on C57Black mice. Proteins, modified by multi-Ub chains of different length and topology, were isolated from liver 1) by immunoprecipitation with antibodies against K48-associated multi-Ub chains (clone FK2); or 2) by pull-down using synthetic protein construct termed Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBE), composed of Ub-binding domains, and thereby allowing specific high-affinity extraction of target proteins, modified by K48- and K63-linked multi-Ub chains. Composition of obtained fractions were tested by immunoblotting with anti-Ub antibodies. Same set of K48- and K63-positive proteins was processed in two different ways: 1) initially separated by SDS-PAGE and then subjected to in-gel trypsinolysis; or 2) directly digested on FK2- or TUBE-conjugated beads. Tryptic peptides were loaded onto Orbitrap mass spectrometer; spectra were analyzed using Mascot. Interactome mapping of identified proteins was carried out using Cytoscape. Resulting protein lists were compared with published proteomic data, obtained from mouse liver by immunoenrichment of di-Gly modified peptides. Suitability of described workflow for functional characterization of Ub-dependent processes as well as feasible applications of obtained data sets, e.g. for biomarker discovery, is discussed. This work was supported by RFBR grants 12-04-01836 and 14-04-01199.

S03-05**COMPREHENSIVE PROTEOME ANALYSIS OF OVARIAN CANCER ASCITES AS A MEDIUM FOR INTERCELLULAR COMMUNICATION****Victoria Shender, Marat Pavlukov, Georgij Arapidi, Nikolay Anikanov, Sergey Kovalchuk, Rustam Ziganshin, Vadim Govorun*****Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia***

Introduction and objectives: Ovarian cancer ascites is a native medium for cancer cells that allows investigation of the secretome of cancer cells in their natural environment. On the one hand, this medium is of interest as a promising source of potential biomarkers, on the other hand, as a medium for intercellular communication. Studies of the ascites with the use of omics technologies can help understand the peculiarities of cancer cell activity in the organism and elaborate new therapeutic approaches. The aim of this study was to elucidate specific features of malignant ascites proteome.

Methods: Proteomes of ascites from ovarian cancer patients and those of portal alcoholic cirrhosis were compared. The content of several small nuclear RNAs in ascites was analyzed. To confirm the result of proteome analysis we examined the proteins exported from ovarian cancer cells in vitro. SK-OV-3 cells were grown for 24 h in serum-free medium, next vesicle-associated and free proteins were separated by differential centrifugation and profiled by mass spectrometry.

Results and discussion: Proteomic analysis allowed us to identify 2096 and 1855 proteins in ovarian cancer and cirrhosis ascites, respectively, 424 proteins were specific for malignant ascites. Functional analysis of the ascites proteome demonstrated that the major differences between cirrhosis and malignant ascites were observed for the cluster of spliceosomal proteins. To confirm this result we demonstrated that several splicing RNAs were exclusively detected in malignant ascites, where they probably exist within protein complexes. Also, this result was confirmed in vitro using ovarian cancer cell line.

Conclusions: Ascites contains various components that participate in cellular communication. Our results raise significant questions about the role of the spliceosomal complexes in the cell–cell communication. Currently we have no direct evidence that the mentioned above ribonucleoprotein complexes could affect neighboring cancer or normal cells however we propose that they could promote cancer cell survival and metastasis by affecting cancer specific splicing changes by yet unknown mechanism.

S03-06**ПРОФИЛЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПЕНУМБРЕ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ИНФАРКТА В КОРЕ МОЗГА КРЫС****Демьяненко С.В., Федоренко Г.М., Узденский А.Б.*****Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия***

Терапия инсульта направлена на ограничение распространения некроза и спасение нейронов и глии в переходной зоне, пенумбре. Мы провели протеомное исследование белкового профиля в пенумбре после локального фототромботического инфаркта (ФТИ) в коре мозга крысы с помощью микрочипов The PanoramaAntibodyArray – Neurobiology (Sigma-Aldrich), в которых иммобилизованы антитела против 224 нейронных и сигнальных белков. ФТИ был вызван лазерным облучением коры мозга после инъекции бенгальского розового. Гистологическое и ультраструктурное исследование через 1 и 4 часа после ФТИ показало, что размер ядра ФТИ - 3 мм, ширина пенумбры - 2-3 мм. В ядре инфаркта наблюдались отек, вакуолизация цитоплазмы, разрушение органелл, дезорганизация миелина. В пенумбре возле ядра ФТИ структурные изменения были сходны, но клетки были более сохранны. На периферии пенумбры встречалось мало измененных клеток, но нормально выглядящие нейроны, глиальные клетки и сосуды были окружены отеком. Протеомное исследование выявило повышение экспрессии белков, участвующих в поддержании целостности, навигации и росте аксонов (NAV3, MAP1, CRMP2, PMP22); в межклеточных взаимодействиях (N-кадгерин); в синаптической передаче (глутаматдекарбоксилаза, триптофангидроксилаза, MUNC-18-3, и синфилин-1); в защите митохондрий (PINK1); в убиквитин-опосредованном протеолизе и очистке ткани (UCHL1, PINK1, синфилин-1); а также антиапоптотических белков (PKBa, ERK5). Эти изменения, а также снижение уровня PKC, PKC β 1/2 и TDP-43 были, в основном, направлены на выживание и восстановление ткани пенумбры. Работа поддержана грантами РФФИ (14-04-00741) и РНФ (14-15-00068).

S03-07

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕЛКА ДЕФЕНЗИНА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМИ И РАСЧЕТНЫМИ МЕТОДАМИ

Хайрутдинов Б.И., Мухамедова Л.Н., Тарасова Н.Б., Идиятуллин Б.З., Файзуллин Д.А., Ермакова Е.А., Гоголев Ю.В., Зуев Ю.Ф.

Казанский институт биохимии и биофизики РАН, г.Казань, Российская Федерация

Дефензины — низкомолекулярные (3.5-6.0 кДа) богатые цистеином катионные пептиды иммунной системы, обладающие биологической активностью в отношении к некоторым видам бактерий и низших грибов. Несмотря на широкое распространение дефензинов и их активную роль в биологических процессах, механизм их действия остается мало изученным. В данной работе методами ЯМР, ИК-спектроскопии и кругового дихроизма исследованы структурные особенности рекомбинантного белка дефензина PsDef-1 сосны обыкновенной (*Pinussylvestris*). Методом спектроскопии ЯМР показано, что PsDef-1 взаимодействует с азидом натрия.

С использованием специализированных штаммов и современных векторных систем, оптимизированы условия экспрессии, выделения, очистки и хранения рекомбинантного белка PsDef1. Выполненный комплекс работ по клонированию и экспрессии PsDef1 позволил разработать оригинальную методику, составленную на основе нескольких протоколов, с учетом свойств дефензина PsDef1 и используемого экспрессирующего штамма RosettaGami(DE3)pLysSB. По данным ИК-спектроскопии и кругового дихроизма у белка PsDef1 обнаружено высокое содержание элементов вторичной структуры, с преобладанием доли бета-структур над альфа-спиралями. Исследования ЯМР на образце с естественным содержанием изотопов ¹³C и ¹⁵N выявили характерные признаки наличия химического обмена, которые проявлялись в значительном уширении спектральных линий и их зависимости от температуры и pH раствора. Эксперименты ЯМР-диффузометрии показали наличие в растворе двух форм белка PsDef1: мономера и димера. Причем при температурах ниже 20°C преобладает димерная форма дефензина, а при температуре выше 35°C — мономерная форма. Обнаружено взаимодействие дефензина PsDef1 с азидом натрия. При добавлении в водный раствор с PsDef1 азид натрия в спектре ЯМР 1H наблюдалось появление дополнительных спектральных линий.

Третичная и вторичная структура белка были сконструированы на основе первичной последовательности с помощью программ FUGUE, Geno3d, I-TASSER. Полученные структуры хорошо согласуются с данными ИК-спектроскопии и известными структурами растительных дефензинов. Методом молекулярного докинга получены предварительные структуры димеров дефензина PsDef1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №12-04-01286-а.

S03-08**ИЗУЧЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, АКТИВИРУЮЩИХСЯ РЕЦЕПТОРОМ IRR В КЛЕТОЧНОЙ И МЫШИНОЙ МОДЕЛИ****Ю.Н. Некрасова, Д.М. Шаяхметова, О.В. Серова, И.Е. Деев, Н.В. Попова, А.Г. Петренко*****Институт Биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия***

Нами было обнаружено, что «сиротский» рецептор, подобный рецептору инсулина (insulin receptor-related receptor, IRR) активируется в слабощелочной среде. С целью более полной характеристики свойств рецептора были проведены эксперименты по выяснению молекулярного механизма функционирования IRR на модельной линии клеток и линии мышей нокаутных по IRR с направленной инактивацией гена *insrg*, кодирующего этот рецептор.

Мы проанализировали работу рецептора на клеточной линии MIN6, которая экспрессирует функционально активный IRR, и по этой причине является удобной моделью для изучения сигнального каскада, запускающегося при активации IRR. Лизаты клеток MIN6, предварительно обработанных щелочным pH, подвергали Вестерн-блот-анализу с применением антител против фосфорилированных форм внутриклеточных белков, вовлеченных в сигнальный путь инсулинового рецептора. Было установлено, что аутофосфорилирование IRR под действием слабощелочной среды приводит к прямому фосфорилированию субстрата инсулинового рецептора 1 типа (insulin receptor substrate 1, IRS-1). Также мы показали, что активация IRR приводит к значительным перестройкам актинового цитоскелета в клетках MIN6. Установлено, что ингибитор семейства рецептора инсулина *linsitinib* блокирует наблюдаемые эффекты под действием щелочного pH. Это указывает на ведущую роль IRR в фосфорилировании IRS-1 под действием щелочи.

Сравнение транскрипционного профиля генов из срезов почек мышей дикого типа и мышей, нокаутных по гену *insrg*, показало, что у нокауты снижена экспрессия как минимум 30 белков и повышен уровень экспрессии приблизительно 60 белков. Наибольший интерес представляет изменение экспрессии белков, вовлеченных в регуляцию кислотно-щелочного, солевого баланса, и в сигнальные пути рецепторов инсулинового семейства. Проверка уровня экспрессии генов, кодирующих белки данных классов, с помощью ПЦР в реальном времени подтвердило статистически достоверное снижение экспрессии гена анионного обменника пендрина (*pendrin*) и повышение экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*IGF-2*) у нокауты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 12-04-91054-НЦНИ_а, 14-04-01736_а, 13-04-90481 Укр_ф_а), Программы фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки – медицине», «Молекулярная и клеточная биология».

S03-09**APPROACHES TO HARNESSING THE COMPLEXITY OF METAPROTEOMIC DATA****Zaripov R.I., Bgatova E.V., Altukhov I.A., Alexeev D.G.*****Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russian Federation***

Complex microbial communities are an integral part of the human body. Determination of microbiome's diversity is important for understanding its role in maintaining the host organism's health and for finding ways to regulate microbial community preventing and treating diseases.

Modern analysis of microbiome includes multiple complementary meta'omic approaches that enable fully and accurately characterize the microbial communities and their interactions with the environment and the host organism. In this study, we try to choose the best reference metaproteome database to explore the diversity of microbiome. After obtaining spectra of peptides from a mass-spectrometer we searched these peptides on primary protein sequences of all variants of selected databases.

A number of challenges, such as the exact identification of each individual peptide, appears because of shortcoming of metaproteome reference database along with the conservatism of some proteins. To assess the quality of protein identification offered some parameters.

To improve the quality of the reference database and identification of peptides this study suggests the following approaches:

- 1) the use of different reference meta proteomic databases: bgi, SwissProt and "triple" database (bgi + SwissProt + E-coli);
- 2) narrowing reference database according to metagenome;
- 3) correcting the reference database with single amino acid polymorphisms (SAAPs).

Moreover a comparison of metaproteome-based phylogenetic tree vs metagenome-based phylogenetic tree was made to find out if they are alike, for a case we have only one of these sets.

It is important not only to study completeness of chosen DBs, but to study their complexity, which depends on a number of well-identified bacteria, a number of bacteria that peptides was sorted with and etc. To asses this complexity we created a set of other parameters.

S03-10

НОВЫЕ МЕТАЛЛ-АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИОНЫ ЖЕЛЕЗА (III), И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ФОСФОПРОТЕОМИКИ.

Подольская Е.П.¹, Краснов Н.В.¹, Александрова М.Л.², Суходолов Н.Г.³, Мозгушин И.А.¹, Шрейнер Е.В.², Гладилов В.Д.², Селютин А.А.³

¹ФГБУН РАН Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург,

Россия, ²ФГБУН "Институт токсикологии ФМБА России", Санкт-Петербург,

Россия, ³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Одним из наиболее распространенных методов, используемых в фосфопротеомике для специфичного выделения фосфорилированных пептидов из биологического образца, является металл-аффинная хроматография. В связи с отсутствием на рынке отечественных металл-аффинных сорбентов, недавно были разработаны и стандартизованы два новых типа структур, содержащих ионы железа(III):

Металл-хелатный сорбент (МХС) представляет собой нерастворимые коллапсированные мономолекулярные слои стеарата Fe(III), полученные по методу Лэнгмюра-Блоджетт. Его преимуществом является то, что поверхность структуры состоит почти полностью из ионов металлов.

Нанодисперсный металл-оксидный сорбент представляет собой оксид железа, полученный золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением. Полученные наночастицы имеют размер не более 10 нм и обладают развитой пористой поверхностью.

Оба сорбента были охарактеризованы (определены удельная поверхность, сорбционная емкость, изоэлектрическая точка, изучены изотермы сорбции), и была показана возможность их использования при решении задач фосфопротеомики.

В том числе, было проведено специфичное извлечение фосфорилированных пептидов из биообразца, представляющего собой ферментативный гидролизат казеина быка. Показано, что сорбция происходит практически полностью, степень извлечения фосфорилированных пептидов составляет не менее 60%. Также было показано, что по специфичным и селективным свойствам сорбент превосходит коммерческий аналог, используемый в аналогичных условиях. Показано, что монофосфорилированные пептиды десорбируются с сорбентов в меньшей степени, чем дифосфорилированные. Нефосфорилированные пептиды на сорбентах практически не удерживаются. Была проведена количественная оценка зависимости степени извлечения фосфорилированных пептидов при различных их концентрациях в сложной биологической смеси (на примере моно- и дифосфорилированных пептидов казеина, помещенных в гидролизат клеточного лизата линии HeLa). Показана линейная зависимость в широком концентрационном диапазоне.

Кроме того, была показана возможность селективного выделения аддуктов зарина с пептидами сывороточного альбумина (фосфорилированных пептидов) человека методом металл-аффинной хроматографии на сорбентах, содержащих железо (III).

S03-11

CYTOTOXIC ACTIVITY OF STREPTOMYCES PEPTIDE METABOLITES AGAINST HELA AND MCF-7 CANCER CELL LINES

Bikmullin A.G.¹, El-Shafei S.M.A.¹, Abd El-Rahman A.A.², Zalyalyutdinova L.M.¹, Validov S.Z.¹, Alimova F.K.¹

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia, ²Minia University, El-Minia, Egypt

In the last several years, there has been an increase in the use of microbial materials in clinical development of new drugs and methods in the treatment of neoplastic processes. It is well known that, *Streptomyces* are efficient technical producers of antibiotics. An interest to *Streptomyces* as source of antimicrobial peptides (peptide metabolites) and peptaibols which have antibiotic, apoptotic and antitumor action increase day by day.

In this regard, the current study was aimed to investigate the cytotoxic activity of peptide metabolites (PM) from *Streptomyces mirabilis* FK749 (this strain was extracted from soil of Republic of Tatarstan) on the viability of HeLa and MCF-7 cancer cells (fraction of PM was purified by gel-filtration and ion-exchange chromatography, molecular weight of PM was measured by MALDI TOF/TOF system and was 680-1800 Da). To achieve this objective, cells were exposed to 0, 20, 40, 60, 80 and 100 mg/ml PM of *S. mirabilis* FK749. After 24h incubation the effect of PM on the viability and apoptotic activity of the cancer cells were assessed by using trypan blue and TMRE assays. Morphological changes were examined. Whereas, the half-maximal inhibitory concentrations of PM were assessed after 72h incubation. The results of this study revealed that treatment HeLa and MCF-7 cancer cells with PM at 40 mg/ml and above concentrations up to 100 mg/ml were found to be cytotoxic and leads to a decrease in the cell viability. The morphological changes observed in HeLa and MCF-7 cells exposed to different concentrations of PM were found to be in a concentration dependent manner. HeLa cells were shown to be more resistant against PM than MCF-7 cells.

S03-12**ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ФАКТОРА ИНИЦИИИ
ТРАНСЛЯЦИИ 2 (Е/аIF2)****Е. А. Столбоушкина, В. И. Архипова, М. Б. Гарбер****Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН,
Пушино, Россия**

У эукариот и архей е/аIF2 является гетеротримерным белком, в котором альфа и бета субъединицы взаимодействуют с центральной гамма субъединицей. В комплексе с ГТФ е/аIF2 специфично связывает инициаторную метионил-тРНК (Met-тРНКi) и доставляет её в Р-участок малой рибосомной субчастицы, таким образом, запуская синтез белка в клетках. Нашей группой была определена структура архейного фактора аIF2 и комплекса Met-тРНКi•аIF2•ГТФ. До сих пор не получено ни одной пространственной структуры эукариотического фактора еIF2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц аIF2 и еIF2 показал существенные различия между этими двумя факторами. Наши исследования в сотрудничестве с профессором И.Н. Шатским (НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ) впервые показали, что аIF2 не способен полностью заменять функции еIF2 будучи добавлен в систему трансляции из млекопитающих, реконструированную из очищенных компонентов, в которой отсутствует эукариотический фактор еIF2. Наши текущие исследования направлены на получение рекомбинантного эукариотического фактора еIF2 и определение его структуры методом РСА.

Нами созданы штаммы-суперпродуценты *Escherichia coli* для всех субъединиц белка еIF2 *Saccharomyces cerevisiae* и *Homo sapiens*. Выделены альфа и бета субъединицы еIF2 в препаративных количествах. Продолжаются эксперименты по выделению гамма субъединицы еIF2. В настоящее время мы получили химерный гетеротримерный фактор е/аIF2, содержащий архейную гамма субъединицу. Данный препарат был использован для кристаллизации. Получены первые микрокристаллы.

S03-13**METABOLOMICS OF ANHYDROBIOSIS IN AN AFRICAN MIDGE *POLYPEDILUM VANDERPLANKI*****Takahiro Kikawada¹, Richard Cornette¹, Elena Shagimardanova², Ruslan Deviatyarov²,
Oleg Gusev²****¹National Institute of Agrobiological Sciences, ²Kazan Federal University**

Larvae of African midge *Polypedilum vanderplanki* in dry seasons enter into "anhydrobiotic" state, completely suppressing metabolism and losing more than 95% of water from their bodies. These anhydrobiotic larvae maintain viability for decades and revive back to active life within 30-50 minutes being placed back to water. In dry state, the larvae shows cross-tolerance to external stresses, including high and low temperatures (-2700 C to + 1000C), organic solvents and excessive doses of radiation (UV, gamma-rays, heavy ions). In the current study we analyzed changes in quantity of 200+ metabolites in different time points in the larvae subjected to desiccation and further revived upon rehydration. We found that the cycle of anhydrobiosis is tightly linked to the major changes in the metabolic profile. The major contributors in this process would be trehalose, kynurenine and members of allantoin cycle. We also anticipate existence of new phytochelatin-type peptides in the sleeping chironomid.

S03-14**EXTRACELLULAR MEMBRANE VESICLES SECRETED BY MYCOPLASMAS ARE ENRICHED IN VIRULENCE PROTEINS****Alexey A. Mouzykantov¹, Natalia B. Baranova¹, Elena S. Medvedeva¹, Tatiana Yu. Grygorieva¹, Maxim V. Trushin², Olga A. Chernova¹, Vladislav M. Chernov¹****¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, ²Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia**

Mycoplasmas (class Mollicutes), the smallest prokaryotes capable of self-replication, as well as Archaea, Gram-positive and Gram-negative bacteria constitutively produce extracellular vesicles (EVs). However, little is known regarding the content and functions of mycoplasma-derived vesicles. Global proteomic profiling of EVs from mycoplasmas (*A. laidlawii* and *M. gallisepticum*) and identification of proteins exported from mycoplasma cells via vesicular structures were the aims of this study.

Taking a proteomics approach using LC-ESI-MS/MS, we have documented for the first time the proteins in EVs secreted by cells of mycoplasmas - *A. laidlawii* (the causative agent of phytomycoplasmoses, the predominant contaminant of cell cultures) and *M. gallisepticum* (the causative agent of chronic respiratory disease in domestic poultry, the predominant contaminant of chicken-embryo based vaccines). We identified 97 proteins in EVs of *A. laidlawii* and 12 proteins in EVs of *M. gallisepticum*. Analysis of the identified proteins indicated that EVs of the mycoplasmas are enriched in proteins that may play critical roles in mycoplasma-induced pathogenesis. Many mycoplasma vesicular proteins are involved in the adaptation of bacteria to stressors, survival in microbial communities and pathogen-host interactions. These findings suggest that the secretion of EVs is an evolutionally conserved, universal process that occurs in organisms from the simplest wall-less bacteria to complex organisms and indicate the necessity of developing new approaches to examine the smallest prokaryotes and to control infects.

This work was supported by grants from the Russian Foundation for Basic Research (12-04-01052a, 13-04-02070), a grant from the President of the Russian Federation (MK-3823.2013.4). The authors are grateful to V.V. Salnikov and G.F. Shaimardanova from the Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KSC RAS for their assistance with TEM, Y.N. Osin from Kazan (Volga region) Federal University for his assistance with SEM, O.V. Pobeguts, I.A. Altukhov and S.I. Kovalchuk from the Research Institute for Physical Chemical Medicine of the Ministry of Public Health of the Russian Federation for their technical assistance with proteomics research.

S03-15

РЕГУЛЯЦИЯ АЗОТНОГО МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКАХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Каюмов Айрат Рашитович, Саегараева Альбина Альбертовна, Тарасов Николай

Викторович

ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

В настоящее время азотный метаболизм молочнокислых бактерий *Lactobacillus* практически не исследован, несмотря на их широкое применение в производстве молочнокислых продуктов, квашении и силосовании. Таким образом, анализ молекулярных механизмов регуляции азотного метаболизма в клетках лактобацилл является актуальной задачей. В единичных работах имеются данные о некоторых аспектах особенностей азотного метаболизма лактобацилл. Предварительный сравнительный анализ генома *L. plantarum* с геномом *B. subtilis* выявил высокую гомологию оперона глутаминсинтетазы и позволил идентифицировать фактор транскрипции GlnR, близкий гомолог которого в клетках *B. subtilis* является репрессором генов азотного обмена в условиях его высокой доступности. Однако, в геноме *L. plantarum* отсутствуют гены белков TnrA и GlnK, играющих ведущую роль в контроле активности генов азотного метаболизма у *B. subtilis*.

Целью работы является исследование молекулярных механизмов контроля азотного метаболизма молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*. Для идентификации эффекторных молекул фактора транскрипции GlnR из бактерий *Lactobacillus plantarum* была создана генетическая конструкция для гиперпродукции рекомбинантного белка GlnR с аффинным гистидиновым тагом и проведена очистка белка методом аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. Проведено исследование эффекторных молекул фактора транскрипции GlnR – регуляторов его активности среди клеточных метаболитов (АТФ, глутамин, АМФ). Исследована ДНК-связывающая активность белка GlnR.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-32317мол_а.

S03-16**ГИПЕРПРОДУКЦИЯ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ HTRA И ЕЕ СВОЙСТВА****Шарафутдинов Иршад Султанович, Гайнутдинова Зухра Рашидовна, Каюмов Айрат Рашитович****ФАГОУ ВПО К(П)ФУ**

В настоящее время при энзимотерапии существуют две взаимосвязанные актуальные задачи: это снижение токсичности протеиназ и возможность управления их ферментативной активностью. Одним из успешных решений этих задач может являться использование протеиназ семейства HtrA – высокоспецифичных ферментов, протеолитическая активность которых модулируется температурой. Использование данного фермента в качестве ранозаживляющего агента потенциально позволит получить низкую токсичность препарата за счет специфичности к денатурированным белкам, а также позволит получить препарат, проявляющий максимум активности при повышенных температурах, наблюдаемых при воспалительных процессах.

Для очистки белка было необходимо получить штамм, обеспечивающий гиперпродукцию рекомбинантного белка HtrA, несущего стреп-таг на С-конце белка. Для этого ген htrA клонировали в экспрессионный вектор pDG148, обеспечивающий гиперэкспрессию продукта данного гена в клетках *E. coli*. Фрагмент ДНК, несущий ген htrA, получали с помощью ПЦР с геномной ДНК *B. subtilis* 168. Полученной генетической конструкцией трансформировали штамм *E. coli* BL21, рекомбинантные штаммы высевали на агаризованной среде LA с антибиотиком ампициллином. Очистку рекомбинантного белка HtrA со стреп меткой проводили на стреп-тактинсефарозе.

Для очищенной протеиназы HtrA определена её максимальная протеолитическая активность при температуре 30°C и pH 7.0. Значение активности полученной протеиназы значительно ниже в сравнении с трипсином, ферментом, используемым в настоящее время в качестве ранозаживляющего препарата. Так же, трипсин, который предпочитают на данный момент в медицинской практике, имеет оптимум pH 8,5 и проявляет максимальную активность при температуре 50°C. Принимая во внимание, что pH оптимум очищенной нами протеиназы близок к pH оптимуму кожи и крови человека, можно ожидать слабые изменения его свойств, при терапевтическом применении.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31635мол_a.

S03-17

CISPLATIN-MEDIATED IMPAIRMENT OF UBE2N ACTIVITY AND PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

E.L. Guryev¹, E.V. Kondratieva¹, A.L. Chernorudsky¹, A.T. Kopylov², Yu.V. Mezencev², V.G.

Zgoda², A.S. Ivanov², M.R. Gainullin¹, **A.S. Zhabereva¹**

¹*Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia,* ²*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

Cisplatin is successfully used for therapy of different types of cancer. Canonical action of cisplatin on cancer cells consists on their DNA damage. Also, it was shown that cisplatin forms covalent adducts with proteins, but biological consequences of this reaction is still unknown. We studied the ability of cisplatin change protein functions using UBE2N/UEV1 complex which catalyzes the synthesis of K63-linked multi-ubiquitin chains. This type of chains critically regulates processes of DNA damage repair. UBE2N autoubiquitilation was also shown, but role of this phenomena stay unknown. On the first step, UBE2N–cisplatin adducts were prepared by incubation UBE2N with cisplatin at two molar ratios. LC/MS-MS were applied for characterization of UBE2N–cisplatin adducts. We identified 10 peptides carrying 4 kinds of adducts. Analysis of UBE2N functional domains shown that modified amino acids are part of the UBE2N/UEV1-interaction area. Modification of active site cysteine was also shown. We reconstructed in vitro both reactions of multi-K63-Ub formation and UBE2N autoubiquitylation to test the ability of cisplatin to influence catalytic activity of UBE2N. Western Blotting was applied for identification of reaction products; SPR technology was used for confirmation of cisplatin-mediated changes of UBE2N protein-protein interactions in real-time experiments. We showed that the specific signal from multi-K63-Ub decreased and depends on UBE2N-to-cisplatin molar ratio. In the reaction of UBE2N autoubiquitylation we observed a decrease in the signal from autoUbi-UBE2N form. Thus, cisplatin reduces catalytic activity of UBE2N. SPR show decreased ability of cisplatin-modified UBE2N binding with UEV1. Our results show that cisplatin modify protein functions via blocking their protein-protein interactions and active site.

S03-18

ALTERED METABOLOME AND PROTEOME PROFILES IN *E. COLI* LACKING HU PROTEIN

A. Vanyushkina¹, D. Kamashev¹, D. Korzhenevskiy², D. Matyushkina¹, I. Butenko¹, O. Pobeguts¹, S. Kovalchuk³, T. Rakitina², V. Govorun¹

¹*Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow, Russia,* ²*National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, Russia,* ³*Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia*

HU is a nucleoid associated protein that is present in every bacterial species. HU binds non-specifically to duplex DNA with a particular preference for targeting nicked or bent DNA. HU deletion is lethal for the majority of bacteria. Although *E. coli* lacking HU is viable, and it is sensitive to a variety of stresses. The effects of the HU protein on gene expression are known from microarray analysis. Absence of this DNA architectural protein causes a disorder in *E. coli* gene regulation. On the other hand, *E. coli* growth at standard conditions is almost unaltered in the absence of HU.

We performed a metabolomic and proteomic analysis to compare *E. coli* lacking HU with wild-type *E. coli*. Comparison of the proteomic profiles was performed using SWATH acquisition on Qq-TOF mass spectrometer. Among the proteins up-regulated in *E. coli* lacking HU are the proteins responsible for amino acid biosynthesis and transport as well as proteins whose expression is induced by either DNA damage or aerobic conditions. We also identified in HU lacking *E. coli* abundant products of genes repressed by *arcA* and *fnr* in wild type, genes responsible for cell division cycle and for DNA binding transcription, genes repressed by DNA relaxation in wild type *E. coli*. Metabolite analysis in our study was performed by hydrophilic interaction liquid chromatography connected with Q-TOF mass spectrometer. Detected changes in the *E. coli* metabolome profile caused by the lack of HU correlate well with the changes in protein content observed in proteomic studies. Up-regulated in HU-lacking cells metabolites indicates involvement HU-protein in DNA and RNA breakdown protection and oxidative and osmotic stress adaptation, as well as in major biosynthesis processes in cells.

S03-19

ОТРАБОТКА ПРОТОКОЛА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА БАКТЕРИЙ РОДА *MYCOBACTERIUM*

Беспятых Ю.А., Шитиков Е.А., Побегуц О.В., Ковальчук С.И., Алтухов И.А., Ильина Е.Н.

ФГБУН ИИИФХМ ФМБА, Москва, Россия

На сегодняшний день актуальным является функциональный анализ информации, реализуемой геномом патогена, что возможно с привлечением методов протеомного тестирования, в том числе количественной протеомики. Целью настоящего исследования было отработать протокол количественного протеомного анализа микобактерий на *M. smegmatis*.

Выбор непатогенного *M. smegmatis* продиктован легкостью культивирования этого микроорганизма в лабораторных условиях, а также возможность сопоставления получаемых данных протеомного профилирования с опубликованными ранее результатами для оценки эффективности обрабатываемых методик.

Экстракцию белка из клеток *M. smegmatis* mc2 155 проводили с использованием различных методик. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, эффективность методик оценивали методом 1D электрофореза с окрашиванием Кумасси. Трипсинолиз проводили в растворе методом FASP и в геле, согласно Zhiguo. Количественный анализ белковых фракций проводили на квадруполь-времяпролетных масс-спектрометрах ABSciexTripleTOF 5600 в режиме SWATH и IDA.

Согласно проведенному анализу максимальный выход белка, 7,8 мкг/мкл, наблюдали при лизисе в буфере: 100 mMTrisHCl (pH 7.6), 4% SDS, 100 mMDDTT, ингибиторы протеаз и лизоцим (1мкг/мл). Микробные клетки подвергали лизису на BeadBeater, с 0,5 мм кремний-циркониевыми шариками в соотношении образец:буфер 1:1, в течение 2 минут. Установлено, что трипсинолиз в геле эффективнее для последующей идентификации пептидов на ABSciexTripleTOF 5600. Трипсинолиз в растворе по методу FASP позволил идентифицировать менее 500 белков *M. smegmatis*, в то время как после трипсинолиза в геле достоверно было идентифицировано более 3500 белков. В общей сложности нами достоверно было идентифицировано 3963 белка *M. smegmatis*, из них 586 представляют собой «основной» (core) и 3377 «дополнительный» (accessory) белковые пулы. Полученные результаты сопоставимы с данными мировой литературы, на основании чего можно делать вывод об эффективности разработанного протокола.

Таким образом, в ходе исследования была проведена инвентаризация белков *M. smegmatis* и отработан эффективный и легко воспроизводимый протокол безметочного количественного белкового профилирования.

S03-20

THE ROLE OF LIVER X RECEPTOR AS THE PROTEIN TARGET OF MEIOSIS ACTIVATING STEROLS

Linara Gabitova¹, Andrey Gorin², Diana Restifo³, Igor Astsaturov¹

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia/ Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA, ²Kazan Federal University, Kazan, Russia, ³Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

As a structural components of lipid membranes sterols play an important role in regulation of surface receptor trafficking and stability. Sterol pathway enzymes, SC4MOL (sterol C4-methyl oxydase-like) and NSDHL (NADPH-dependent steroid dehydrogenase-like) catalyze two sequential steps of oxidative C4-decarboxylation of meiosis activating sterols (MAS) and arrest of this step sensitizes several cancer cells to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeting drugs altering EGFR trafficking and signaling (Sukhanova, 2013). We investigated whether the anti-EGFR activities of MAS metabolites are mediated via their interaction with liver X receptor (LXR) and its transcriptional targets activation.

We have found that NSDHL and SC4MOL deficiency in EGFR-positive carcinoma cell lines and primary fibroblasts leads to induction of LXR canonical targets expression, such as ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) and inducible degrader of low density lipoprotein receptor LDLR (IDOL), which promotes LDLR degradation. These effects were reversible with inactivation of LXRA, or via inactivation of an upstream enzyme, CYP51A1, which eliminated MAS. Conditional deletion of a “floxed” *Nsdhl* allele via the *K14-Cre* transgene also induced ABCA1 expression in the skin, arrested keratinocytes proliferation and caused lethality in newborn NSDHL-null male pups. NSDHL-deficiency was also shown to prevent immortalization of fibroblasts with mutated KRASG12D by induction of the cellular senescence *in vitro*. *In vivo* model of EGFR-dependent skin KRASG12D carcinogenesis also revealed the anti-proliferative effect of NSDHL deficiency, and the tumor growth in NSDHL-null males was abrogated suggesting that progression of EGFR-KRAS activated tumors is dependent on cholesterol biosynthesis. Direct manipulation of SREBP2, LXR or LDLR in carcinoma cell lines produced concordant synergistic effects with anti-EGFR drugs suggesting novel combinatorial strategies to treat EGFR-positive carcinomas.

Together these data suggest that LXR activated by MAS, accumulating as a result of SC4MOL or NSDHL inhibition, suppresses oncogenic signaling in carcinomas with activated EGFR-KRAS axis.

S03-21

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АДДУКТОВ ГЕМОГЛОБИНА С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Дубровский Я.А., Ануров М.С., Шмурак В.И., Бабаков В.Н.

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

В результате метаболизма ксенобиотиков может происходить их детоксикация или биоактивация с образованием более токсичных соединений. Для большинства лекарств пути метаболизма можно разделить на две группы: Фаза 1 и фаза 2. В первой фазе происходит образование или модифицирование функциональных групп (окисление, восстановление, гидролиз). Во второй фазе происходит конъюгация с эндогенными веществами. Основные белки крови – сывороточный альбумин и гемоглобин, легко взаимодействующие своими аминокислотными остатками с электрофильными соединениями наиболее доступны для проведения исследований. Анализ и идентификация таких аддуктов с белками крови (нестандартная посттрансляционная модификация) является важной задачей фармакокинетики и фармакодинамики.

Целью работы была разработка метода идентификации аддуктов гемоглобина человека с метаболитами лекарственных препаратов на примере ацетаминофена (APAP, парацетамола) и ацетилсалициловой кислоты (ASA, аспирин).

После первой фазы метаболизма парацетамола образуется N-ацетил-п-бензохинонимин (NAPQI). Окисленную форму парацетамола получали с использованием электрохимической ячейки (ROXY, Antec). Смесь парацетамола и его метаболита NAPQI добавляли к раствору гемоглобина человека, после чего инкубировали, обрабатывали трипсином и анализировали с использованием МАЛДИ и ВЭЖХ-МСМС.

В масс-спектрах триптического гидролизата гемоглобина были обнаружены сигналы немодифицированного и модифицированного NAPIQ пептида с МН+ 2529,2 Да и 2678,3 Да соответственно (фрагмент 84-96 бета-субъединицы). Пептиды были идентифицированы с использованием CID и ETD фрагментации. Присоединение NAPQI происходит по остатку цистеина-94 в результате чего происходит увеличение массы на 149,07 Да.

После инкубирования цельной крови с ASA, были обнаружены ацетилированные лизины. В масс-спектрах триптического гидролизата были идентифицированы два модифицированных пептида с МН+2085,12 Да (фрагмент 13-32 α -субъединицы) и МН+ 2255,18 Да (фрагмент 42-61 α -субъединицы). Ацетилирование гемоглобина происходит по Lys – 17 и Lys – 57 вальфа – субъединице.

В ходе работы был разработан подход по идентификации аддуктов гемоглобина человека с лекарственными препаратами. Белковые аддукты являются перспективными биомаркерами в изучении токсичности ксенобиотиков.

S03-22

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИИ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* С ОРГАНЕЛЛАМИ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА.

Побегуц О.В., Матюшкина Д.С., Лазарев В.Н., Говорун В.М.

ФБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва, РФ

Род *Mycoplasma* относится к Грам-положительным бактериям без клеточной стенки, способным вызывать хронические заболевания у человека и животных. Для ряда микоплазм было показано, что они способны оказывать воздействие на развитие апоптоза в клетках-хозяина.

Объектом нашего исследования служила *Mycoplasma gallisepticum*, которая паразитирует в домашней птице. В ряде работ была показана способность *M. gallisepticum* проникать внутрь эукариотических клеток. Способность *M. gallisepticum* к длительному внутриклеточному персистированию, а также ее участие в развитии апоптоза в клетке хозяина, может указывать на возможное влияние микоплазм на метаболизм клетки-хозяина и внутриклеточных органелл. В частности, особенный интерес для нас представляет исследование возможного взаимодействия микоплазмы с митохондриями и их влияния на запуск митохондриального пути апоптоза.

Было проанализировано взаимодействие *M. gallisepticum* с изолированными митохондриями из печеночной ткани *Gallusdomesticus* методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного мечения. В ходе эксперимента мы показали, что при совместной инкубации *M. gallisepticum* способна адгезироваться на поверхности митохондрий. При обработке микоплазмы трипсином подобного взаимодействия не наблюдалось, что может свидетельствовать о его белок-белковой природе. При этом показано, что «неродственные» представители класса Молликут (*Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma melliferum*) не обладают способностью к подобному взаимодействию с митохондриями. Кроме того, для *M. gallisepticum* не наблюдалось взаимодействия с другими внутриклеточными органеллами.

Для определения белков, участвующих в процессе адгезии *M. gallisepticum* с мембраной митохондрий, были использованы сшивающие агенты BSOCOES, SulfoEGS и DSP (Thermoscientific, США). В ходе подобных кросс-сшивок были определены белки *M. gallisepticum*, специфически связывающиеся с митохондриями: glycosyltransferase, hypothetical protein GCW_02844, VlhAprotein, cytoadherencelated molecule B (CrmB), hypothetical protein GCW_03813, hypothetical protein GCW_00045, hypothetical protein GCW_01400, hypothetical protein GCW_00655.

На основе полученных данных, можно предположить, что *M. gallisepticum* может взаимодействовать с митохондриями в клетке-хозяина *in vivo*, влияя на функциональную активность митохондрий, что может играть роль в запуске митохондриального пути апоптоза.

S03-23

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА 1A В ЭКЗОСОМАХ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ *HEPG2* КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИЕЙ

Воронцова Е.В., Гришанова А.Ю., Ляхович В.В.

ФГБУ "НИИМББ" СО РАМН г. Новосибирск

Гепатоциты, как и большинство клеток, секретируют экзосомы - внеклеточные везикулы, образующиеся внутри клетки, которые, являясь очень мелкими (до 200 нанометров в диаметре), могут попадать в кровоток. Биохимический состав этих везикул на данный момент практически не изучен, и отсутствуют работы, по исследованию ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков, выполненных на клеточных линиях человека. Теоретически наличие этих ферментов в экзосомах, происходящих из печеночных клеток, предполагает возможность транспорта этих ферментов из печени к другим клеткам организма. Вопрос о возможности включения в состав экзосом ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков и их метаболитов в настоящее время открыт. Экзосомы, секретируемые *HepG2* гепатоцитарной клеточной линией человека были выделены из культуральной жидкости ультрацентрифугированием (100000g). Методом иммуноблотанализа был оценен уровень белка цитохромов P450 подсемейства 1A1 и 1A2 в *HepG2* клетках и в экзосомах, секретируемых этими клетками. Показано, что экзосомы, так же как и *HepG2* клетки имеют в своем составе белок CYP1A1 и CYP1A2. При равном количестве общего белка (15мкг) в клетках и экзосомах, наносимом на дорожку, содержание CYP1A1 и CYP1A2 в экзосомах меньше чем в клетках в 5-10 раз. Таким образом, впервые продемонстрировано наличие ферментов биотрансформации ксенобиотиков в экзосомах, секретируемых клеточной линией человека, что является важным для теоретических предпосылок исследования экзосом печеночного происхождения в плазме крови человека.

S03-24**THE IDENTIFICATION OF SMALL OPEN READING FRAME (SORF) IN GENOME OF THE MOSS *PHYSCOMITRELLA PATENS***

Small open reading frames (sORFs, up to 100 codons) have the potential to encode biologically active peptides that have regulatory roles in eukaryotic cells. The aim of our work was to identify of the sORF in genome of model plant – *P. patens moss*. To identify sORF that coding peptides, high-throughput RNA-Seq by SOLiD 4 genetic analyzer (Life Technologies, Applied Biosystems) and identification of native peptides by TripleTOF 5600 LC-MS/MS (ABSciex) has been carried out on gametophore, protonema and protoplast cells of moss *Physcomitrella patens*. Optimal procedure for endogenous peptide extraction and identification has been worked out to demonstrate translation of sORFs.

Using sORFfinder, we distinguished 241,228 sORFs within intergenic region with high coding potential. RNA-Seq confirmed transcription of 8,450 sORFs from intergenic region. Tandem mass-spectrometry analysis resulted in identification of 44 peptides derived from 27 sORFs within intergenic region, 52 peptides derived from 42 sORFs that were previously thought to be untranslated region of mRNAs and more than 100 peptides from about 100 alternative sORFs within previously known ORFs. Comparative analyses of sORFs sequences distinguished in moss *Physcomitrella patens* with genomes of other plant species revealed high conservation in terms of synonymous/nonsynonymous substitutions.

S03-25

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ АРХЕЙНЫХ БЕЛКОВ SmAP

Мурина В.Н., Леконцева Н.В., Михайлина А.О., Никонова Е.Ю., Тищенко С.В., Никулин А.Д.
**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт белка
 Российской Академии Наук**

SmAP белки архей принадлежат к большому семейству Sm-подобных или Lsm белков. В геномах архей идентифицируют гены, кодирующие один или два различающихся Lsm белка, называемых SmAP1 и SmAP2. Белки семейства SmAP2 ближе по гомологии к эукариотическим Lsm белкам, а белки семейства SmAP1 более гомологичны бактериальным Lsm белкам Hfq. Так в архее *Methanococcus jannaschii* SmAP1 способен формировать тройной комплекс с мРНК и регуляторной РНК *in vitro* и заменять свой бактериальный аналог в клетках *E. coli*, в которых нокаутирован ген *hfq*. Однако, в отличие от своих бактериальных гомологов, имеющих разные участки связывания мРНК и регуляторных РНК, этот белок имеет один общий сайт связывания РНК. С другой стороны архей, как и бактерий, являются одноклеточными, и в них отсутствуют ярко выраженные органеллы; множество ключевых свойств метаболизма РНК в археях гораздо ближе к эукариотам, чем к бактериям. Тем не менее, в археях отсутствует развитая система процессинга РНК, в которой эукариотические Sm и Lsm белки выполняют важную роль, входя в состав сплайсосом и теломераз.

Определение функций архейных белков SmAP может пролить свет на эволюцию ключевых этапов процессинга РНК в эукариотах. Наш проект предполагает структурно-функциональные исследования РНК-связывающих свойств архейных белков SmAP обоих типов, включая белки из *Methanococcus jannaschii* и *Haloarcula marismortui*, наиболее гомологичные бактериальным Hfq. Это позволит не только структурно охарактеризовать исследуемые белки и формируемые ими комплексы с различными РНК, но и показать их роль в регуляции экспрессии генов в археях.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-14-00496.

S03-26**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО КЕРАТИНА 17 ЧЕЛОВЕКА****Юнусбаева М. М., Юнусбаев Б. Б., Хуснутдинова Э.К.*****Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимский научный центр Российской академии наук, г. Уфа, Россия***

У здорового человека белок кератин 17 обнаруживается исключительно в волосных фолликулах, ногтевых пластинках, сальных и потовых железах. Продемонстрировано влияние кератина 17 (K17) на регуляцию клеточного роста и размера кератиноцитов, а также процессы регенерации и миграции клеток (Mazzalupo Setal, 2003; Kim Setal., 2006). Важной особенностью K17 является его быстрая экспрессия в месте пореза, а также в псориазных очагах.

Целью данного исследования является получение рекомбинантного белка кератина 17 с последующим анализом реакции клеток человека на данный белок.

Ход исследования:

Учитывая ограниченное представление K17 в организме человека, нами был разработан протокол выделения пула РНК из волосных луковиц, полученных с волосистой части головы больных псориазом. Качество и количество РНК оценивалось с помощью капиллярного спектрофотометра NanoDrop1000 и электрофореза в 1%-ом агарозном геле. Реакция обратной транскрипции и последующая амплификация ПЦР - продукта K17 на специфичных праймерах проводилась по стандартным методикам. Штамм-продуцент был создан на основе вектора pGEX4T1 (GE Healthcare) путём клонирования последовательности K17 и использованием экспрессирующей системы реципиента *E. coli* BL21 (DE3). В полученной генно-инженерной конструкции транскрипция клонированного гена контролируется промотором гена 10 фага Т7, а биосинтез целевого продукта индуцируется с помощью химического соединения - изопропил-β-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Динамику роста микробной популяции контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) клеток на спектрофотометре при длине волны 600 нм. При достижении значений ОП 600=0,6 о.е. в культуральную среду добавляли ИПТГ для индукции биосинтеза целевого белка. Динамику накопления целевого продукта изучали в ходе отбора образцов биомасс в определенный момент роста культуры с последующим их анализом в 12,5% ПААГ-SDS. После завершения культивирования бактериальную суспензию осаждали путём центрифугирования при 8000g в течение 15 мин. Для получения рекомбинантного белка осадок бактериальных клеток ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 0,1 мг/мл лизоцима, 0,1 % Тритона X-100, 1мМ PMSF, 0,2 М NaCl, pH 8,0. Клеточную суспензию трижды замораживали-оттаивали, добавляли ДНК-азу (Sigma, США) в конечной концентрации 5 ед/мл в присутствии 20 мМ MgSO₄. После инкубации в течение 1 часа бактериальную суспензию обрабатывали ультразвуком (6 раз по 10 с). Очистку белка осуществляли методом аффинной хроматографии с применением глутатион-сефарозы (GE Healthcare). Белок элюировали раствором 10 мМ восстановленного глутатиона в 50 мМ TrisHCl, pH 8,0. Белковые фракции анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с использованием 12,5 % ПААГ-SDS по методу Лэммли. Удельное содержание целевого белка в исследуемых фракциях оценивали путём денситометрии электрофореграмм на основе компьютерной программы TotalLab. Таким образом, в ходе выполнения описанных выше процедур нами был получен рекомбинантный белок кератин 17 человека.

S03-27**THE SEARCH AND IDENTIFICATION OF PEPTIDE BIOMARKERS OF COLORECTAL CANCER IN SERA**

Igor Azarkin, Rustam Ziganshin, Sergey Kovalchuk, Georgy Arapidi, Nikolay Anikanov, Olga Ivanova, Viktoria Shender, Vadim Govorun, Vadim Ivanov

IBCH RAS

Colorectal cancer (CRC) is a common and deadly disease in the world. The average lifetime risk to develop nonhereditary, sporadic CRC is approximately 5%. Each year more than one million people are diagnosed with CRC and about half of them die from this malignancy. Stage of the disease, is an important prognostic factor, with five year survival rates of more than 90% for localized CRC (stage I) and only about 10% for CRC that metastasized to distant organs(stage IV). The aim of the present work was a search and identification of peptide markers of CRC in sera using modern mass spectrometry techniques.

Blood sera obtained from 50 patients with CRC and 50 healthy donors (control) were used for isolation and identification of peptides. Serum samples of each analyzed groups were fractionated using magnetic beads with weak cation exchange surfaces, obtained eluates were analyzed by nanoLC-MS/MS using ABSciexTripleTOF 5600. All samples were analyzed by DDA (identification of serum peptides) and by SWATH (for label-free relative quantitative mass spectrometry analyses) approaches.

As a result of LC-MS/MS analysis of sera more than 6000 unique peptides originated from the almost 1000 unique proteins were identified. Among identified peptides 786 were unique for CRC samples, and 125 of those were originated from the proteins unidentified in the control samples. For the control group there were 1075 unique peptides, 259 of which were originated from the proteins unidentified in CRC samples.

We believe that the presented data set contains valuable information which will enable interested researchers to identify of new potential biomarkers for colorectal cancer.

S03-28

**ЦИТО- И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ТРОМБОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
B. PUMILUS 7P****Данилова Ю. В., Салафутдинов И. И., Маргулис А. Б., Шарипова М. Р.**
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет. Казань, Россия.

В настоящее время является актуальным разработка новых эффективных тромболитиков, в том числе на основе ферментов бактериального происхождения. Ранее нами было показано, что субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза *B. pumilus* 7P обладают тромболитическими свойствами. В работе представлены результаты по исследованию цито- и генотоксичности протеиназ *B. pumilus* 7P. Цитотоксическое действие ферментов определяли по степени дегенерации клеточного монослойнейробластомы человека SH-SY5Y, а также по соотношению количества мертвых и живых клеток до и после обработки их белками. Было показано, что исследуемые протеиназы не проявили токсических эффектов. Генотоксичность по отношению к клеткам эукариот бактериальных протеиназ оценивали с помощью микроядерного теста. Было показано, что исследуемые протеиназы в изученных концентрациях не обладали кластогенным эффектом, т.е. под их воздействием микроядра в эритроцитах не образовывались.

Таким образом, отсутствие цито- и генотоксичности у глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* 7P позволяет рассматривать эти бактериальные ферменты в качестве потенциальных средств для применения в тромболитической терапии.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности К(П)ФУ среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также частично за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект №14-83).

S03-29**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА**

Горбачев А. Ю., Фисунов Г. Ю., Бутенко И. О., Ванюшкина А. А., Побегуц О. В., Говорун В. М.
ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России

Бактерии класса Молликут являются наиболее просто устроенными бактериями, способными к репликации на искусственных питательных средах. Одним из представителей данного класса является *Mycoplasma gallisepticum*. Данный микроорганизм является ближайшим родственником таких человеческих патогенов, как *M. pneumoniae* и *M. genitalium*.

Ранее мы провели транскриптомный анализ *M. gallisepticum* и показали роль терминирующих шпилек в регуляции транскрипции в условиях теплового стресса. Кроме того, ответ клеток на тепловой стресс был одним из самых мощных ответов на транскрипционном уровне.

Мы использовали технику высокопроизводительной масс-спектрометрии (SWATH-анализ) для детекции количественных изменений 238 белков в *M. gallisepticum*. Мы также сравнили данные SWATH анализа с классической методикой двумерного гель-электрофореза с дифференциальным окрашиванием.

Используя ранее полученные данные транскрипционного анализа, мы провели мета-анализ данных, включающих изменения уровней мРНК, белка и метаболитов в условиях теплового шока.

В нашем исследовании мы разделили реакции, связанные с непосредственно ответом на тепловой шок, и реакции, сопутствующие ему и запускающие процесс патогенеза.

Основными находками нашего исследования стали: семикратное возрастание уровня АТФ, разгон клеточного метаболизма с переходом в окислительный стресс за счет повышения скорости генерации перекиси, а также сброс поверхностных антигенов.

S03-30**THE SWATH™ ACQUISITION: NEXT GENERATION DATA-INDEPENDENT (DIA) MASS SPECTROMETRY FOR COMPLETE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE SAMPLE ANALYSIS****Volker Krufft****AB Sciex**

Recent advances in high resolution mass spectrometry, specifically QqTOF technology, have made it possible to acquire qualitative and quantitative information simultaneously from highly complex samples. The extreme speed and sensitivity of current instrumentation allows near complete analysis in information dependent (IDA) experiments. However, the concept of data independent acquisition (DIA) can now also be realistically applied for the first time. This will avoid the bias introduced by precursor selection and thus increase the reproducibility and comprehensiveness of data collection. In this data independent workflow – called MS/MS^{ALL} with SWATH™ acquisition – the Q1 quadrupole is stepped at defined mass increments across the mass range of interest, for example passing a 25 amu window into the collision cell independent of the number of precursors. Fragments – so called product ions - are analyzed in the TOF MS analyzer at high resolution. Due to the high speed of the QqTOF, these experiments can be done in a looped fashion at a cycle time compatible with LC separations. Post-acquisition MRM-like analysis can be performed on such datasets by the generation of large numbers of high resolution XIC's. These are identified and quantified by comparison to the available proteomic or MRM databases.

The SWATH workflow will be explained and compared to other quantitative techniques in systems biology like quantification via SRM/MRM. Recently published investigations will be highlighted, including studies of kidney disease and the proteome of *M. tuberculosis*.

S03-31

ИММУНОГЕНЕТИКА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА К НЕГАТИВНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Кофиади И.А., Алексеев Л.П.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Индивидуальные фенотипические различия организмов одного вида связаны с существованием аллельного полиморфизма генов. Различные варианты одного гена могут кодировать молекулы с существенно отличающимися биохимическими характеристиками, что отражается на функциональных особенностях конкретного организма, в том числе на его восприимчивости к негативным факторам окружающей среды. Ключевой системой, контролирующей механизмы защиты и восстановления организма в ответ на внешнее воздействие, является иммунная система. Таким образом, гены иммунной системы определяют устойчивость и восприимчивость человека к негативным факторам окружающей среды, а также риск развития отдаленных последствий действия этих факторов. В связи с этим, одним из наиболее перспективных направлений современной иммунологии и медико-биологической науки в целом, является иммуногенетика.

В настоящее время диагностика функциональных и клинических признаков ведется, как правило, средствами прямого измерения активности (концентрации) маркера патологического процесса (маркеры апоптоза, воспаления, метаболиты органических и неорганических веществ) или оценки текущего физиологического состояния человека. Эти методы часто не дают объяснения причин развития патологий и не оставляют возможности для своевременного назначения терапии или ее коррекции. Комплексная оценка иммуногенетических, физиологических и биохимических параметров организма позволяет решить эти вопросы, а также открывает новые возможности в области профилактики и прогнозирования риска развития патологий.

В данном контексте наиболее актуальной представляется характеристика индивидуальной реакции человека на факторы, оказывающие комплексное действие на защитный и восстановительный потенциал организма, и обуславливающие отсроченные клинические эффекты, прогнозирование которых поможет предотвратить их развитие. К данному типу воздействий относится, в частности, такой важный с медицинской точки зрения фактор, как радиация.

Установлено, что реакция организма человека на радиационное воздействие варьирует в широком диапазоне проявлений и носит индивидуальный характер. В первую очередь это связано с полиморфизмом генов, контролирующих процессы восстановления организма после облучения, а также с индивидуальными иммунофизиологическими факторами, регулирующими иммунный ответ. Иммунная система, ответственная за поддержание генетического гомеостаза организма, противoinфекционную и противоопухолевую защиту, является наиболее чувствительной к действию радиационного фактора. Это во многом определяет развитие ранних и отдаленных эффектов облучения. Таким образом, изучение наследуемых и функциональных особенностей иммунитета, ассоциированных с индивидуальной реакцией организма человека на радиационное воздействие, является актуальной задачей, требующей решения.

Сотрудниками ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, совместно со специалистами Уральского научно-практического центра радиационной медицины ФМБА России было проведено генетическое обследование хронически облученных лиц и впервые установлена связь ряда генов системы репарации ДНК и иммунного ответа (гены системы HLA) с состоянием здоровья обследованных лиц в отдаленном периоде. В настоящее время область применения разработанных методов расширена за счет иммуногенетической и иммунофизиологической характеристики краткосрочных эффектов облучения диапазона терапевтических доз, включающей функциональную оценку иммунного ответа в части распознавания антигена и реализации эффекторного звена иммунитета у пациентов, проходящих курс радиотерапии.

В ходе исследования создано более 50 оригинальных тест-систем для диагностики генетических маркеров и оценки цитокинового профиля, разработано программное обеспечение, позволяющее проводить качественный и количественный анализ исследованных параметров, проведено обследование более 1000 человек. Продолжение исследований в рамках НИР и НИОКР позволит создать отечественную аппаратно-диагностическую базу для проведения генетических исследований в области медицины, а также разработать технологию прогнозного иммунологического профилирования на основе индивидуального генетического обследования. Полученные данные и разработанные методы могут быть использованы в целях проведения профотбора при формировании контингентов, работающих в условиях повышенного риска радиационного воздействия и при генетическом консультировании лиц, задействованных в атомной промышленности, а также в профильных медицинских учреждениях для оценки риска развития осложнений терапевтического радиационного воздействия.

S03-32

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ *STREPTOMYCES* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПОЧВ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ GEN III OMNILOG

Ч. Болормаа, А.Н. Ибрагимов, К.А. Сапармырадов, Ф.К. Алимова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии

Цель работы

Метаболическое профилирование изолятов *Streptomyces* из различных районов республики Татарстан, с помощью системы GEN III OmniLog.

Введение

Морфологические свойства совпадают для большинства видов *Streptomyces* поэтому процесс поиска их уникальных черт связан со значительными затратами времени и усилий. Система GEN III OmniLog® II Combo Plus основанная на мультисубстратном тестировании может быть применена для быстрой идентификации и характеристики актиномицетов. Каждый планшет содержит различные источники азота и углерода, в свою очередь каждый микроорганизм имеет определенный профиль потребления субстратов, зависящий от активности его метаболических путей.

Результаты

По полученным результатам была построена дендрограмма, отражающая взаимосвязь между метаболическими профилями исследованных штаммов после инкубации 36 часов на микропланшетах GEN III. Штамм S.749, идентифицированный как *S. mirabilis*, сильно отличается по потреблению субстратов от остальных и образует отдельный кластер.

Второй кластер включает остальные 4 штамма и делится на 2 подкластера. В первый подкластер попали штаммы S.909, относящийся к виду *S. badius*, и штамм S.187 отнесенный к виду *Streptomyces violaceoruber*. Штаммы схожи по интенсивности разложения полисахаридов. Таким образом, можно предположить, что штамм S.187 по биохимическим признакам близок к виду *S. badius*.

Второй подкластер включает штаммы S.130 и S.549, идентифицированные как *S. violaceolatus* и *S. fimicarius*, соответственно. Эти штаммы хорошо утилизируют декстран, D-трегалозу, D-целлобиозу, гентиобиозу, сахарозу, D-гуранозу, стахиозу, D-раффинозу, α-D-лактозу, D-мелибиозу, α-D-глюкозу, D-маннозу, D-фруктозу, D-галактозу, N-ацетил-D-глюкозамин, L-гистидин, L-аспарат, D-сорбитол.

Заключение

В данной работе мы провели биохимическую характеристику пяти штаммов *Streptomyces* выделенных из различных районов республики Татарстана с помощью системой GEN III OmniLog® II Combo Plus. На основании данных филогенетического анализа штаммы S.549 и S.909 были отнесены к одному кладу, в то время как по своим биохимическим свойствам они достаточно сильно отличаются друг от друга. Особенно сильно они отличаются по потреблению некоторых полисахаридов, аминокислот и осмочувствительности.

S03-33

УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРОТЕАСОМЫ И ЕГО РОЛЬ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Белогуров А.А., Габибов А.Г.

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Рассеянный склероз (РС) – это системное аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы человека, характеризующееся множественными повреждениями белого вещества. Среди главных аутоантигенов при РС выделяют несколько белков миелиновой оболочки, в том числе основной белок миелина (МВР), в значительных количествах присутствующий в мембране олигодендроцитов. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также мультикаталитического протеиназного комплекса – протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушаются 26S протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Нами было установлено, что МВР принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствие молекул убиквитина. Молекулярный механизм гидролиза МВР включает в себя заряд-опосредованное связывание с субъединицей Rpn10 регуляторной 19S субчастицы. Протеасома является главным протеолитическим комплексом, генерирующим пептиды, презентруемые на поверхности клетки в контексте комплексов гистосовместимости I класса. Отсутствие контроля за гидролизом МВР со стороны системы убиквитинилирования означает, что качественный и количественный спектр пептидов МВР, презентруемых на поверхности олигодендроцитов, практически полностью определяется каталитическими субъединицами протеасомы. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ) – животной модели рассеянного склероза – в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом имуносубъединица $\beta 1i$ локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что повышенное содержание иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов МВР, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона МВР. Активированные CD8⁺ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор имуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на возможную связь между убиквитин-независимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием рассеянного склероза, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 14-14-00585 «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии».

S04-01

THE SYSTEMS APPROACH FOR CONSTRUCTION OF THE GENOTYPE-PHENOTYPE MAP

Vitaly Gursky¹, Konstantin Kozlov², Ivan Kulakovskiy³, Sergey Nuzhdin⁴, Maria Samsonova²

¹*The Ioffe Physical Technical Institute RAS, St. Petersburg, Russia*, ²*St. Petersburg Polytechnic State University, St. Petersburg, Russia*, ³*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia*, ⁴*University of Southern California, USA*

Gene networks control organism phenotype in health and disease by dynamically processing information introduced by genotype and environment. We are rapidly entering an era of “personal genomics” wherein data on gene structure and expression will be available for large numbers of individuals. Such experiments demonstrated the existence of abundant variation in individual DNA, however a fundamental challenge, critical for realizing the promise of personalized medicine, is discerning how and why some individual variations lead to phenotypic changes, while others do not. We develop the concepts and models necessary to advance this goal using *Drosophila*, where the molecular tools are precise and quantitative predictions are verifiable. A developmental process – early embryo segmentation – is ripe for attack. This network is well-characterized and a wealth of functional data is available, including DNA binding sites and cellular resolution concentrations of critical transcription factors (TFs). In this study, we developed a new predictive model that provides a dynamical description of gap gene system, using detailed DNA-based information, as well as spatial TF concentration data at varying time points and applied it to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 216 sequenced *Drosophila* genotypes. We found that the binding sites for TFs with strong effect onto regulating the gap gene network exhibit reduced polymorphism. By quantifying the influence of each SNP on gap gene expression in the model, we demonstrated that the regulatory effects from multiple SNPs combine nonlinearly. We calculated the distribution of these regulatory effects and showed that its specific form leads to the effect in which SNPs with more strong influence on gene expression tend to appear less frequent in the population. Population SNP influence on expression shows very weak correlation with the binding affinity of corresponding polymorphic binding site, providing the evidence that the ultimate effect that a SNP exerts on phenotype is effectively shifted to the level of regulatory interactions between binding sites. Taken together, these results provide a system level view of how genetic variation translates to the gene expression level.

S04-02

MDR-EFE МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КОМПЛЕКСНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Александр Ракитко

МГУ им. Ломоносова, механико-математический факультет (Москва, Россия)

Во многих стохастических моделях возникают данные высоких размерностей. Подобная ситуация характерна для медико-биологических исследований, в которых функция отклика Y , описывающая состояние здоровья пациента, зависит от набора факторов $X=(X_1, \dots, X_n)$. Так, например, $Y=1$ или $Y=-1$ означает, что пациент болен или здоров соответственно. В генетических задачах в качестве факторов рассматриваются одиночные нуклеотидные полиморфизмы (SNP), а также факторы окружающей среды (кровяное давление, степень ожирения и т.д.). Однако зачастую функция отклика Y зависит не от всех факторов $X=(X_1, \dots, X_n)$, а лишь от некоторого *значимого* набора $\{X_{k_1}, \dots, X_{k_r}\}$, где $0 < k_1 < \dots < k_r < n+1$. Выявление значимых наборов представляет собой нетривиальную проблему, которой посвящена целая область научных исследований (GWAS).

Для решения подобных задач в [2] был разработан метод (MDR-EFE), основанный на понижении размерностей. Основная идея заключается в том, что функции f , прогнозирующие отклик Y по различным наборам факторов, упорядочиваются в соответствии с некоторым функционалом ошибки $E_{\text{tr}}(f)$ для произвольных штрафных функций ψ . Распределение случайных элементов X и Y неизвестно, поэтому статистические выводы основаны на оценках $E_{\text{tr},K}(f_{\text{RA}})$ функционала ошибки, вовлекающих предсказательный алгоритм f_{RA} , оценку штрафной функции ψ и К-кросс валидацию.

В статье [1] описанная выше задача была обобщена на случай многозначной функции отклика. Кроме того, будет рассказано обобщение метода на случай, когда множество значений функции отклика не допускает линейного упорядочивания (например, Y описывает подкласс ишемического инсульта: атеротромботический, кардиоэмболический или лакунарный и т.д.) Также рассматриваются результаты применения построенной процедуры к анализу сгенерированных данных и данных, полученных клиническими исследованиями. Построенный метод сравнивается с общеизвестными способами понижения размерностей (напр., DPCA, LASSO, MDR).

[1] А.В. Булинский, А.С. Ракитко, Оценивание небинарного случайного отклика, Доклады РАН, 2014, т. 455, №6, с. 623-627.

[2] Bulinski, O., V. Sadovnichy et al. Statistical Methods of SNP Data Analysis and Applications, Open Journal of Statistics, Vol. 2 No. 1, 2012, pp. 73-87.

S04-03**THE UNDERSTANDING EFFECTS OF GENETIC VARIATION AND ALTERNATIVE SPLICING ON PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN COMPLEX GENETIC DISORDERS****Xingyan Kuang¹, Nan Zhao², Andi Dhroso³, Hongzhu Cui³, Nathan Johnson³, Dmitry Korkin³****¹University of Missouri, Columbia, MO, USA, ²Mississippi State University, Mississippi State, MS, USA, ³Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA, USA**

Rapidly increasing volumes of high-throughput biological data have allowed scientists to study complex diseases, such as cancer, diabetes, and neurological disorders from the systems perspective. These advancements have led to discovery of a plethora of new regulatory mechanisms associated with the diseases. For instance, it has been recently suggested that rare genetic variation, variation in copy numbers, and post-transcriptional variation play an important role in defining the disease phenotype. Here, we discuss our recent efforts to understand the regulatory role of genetic variation and alternative splicing in complex genetic diseases through understanding their effects on the protein interactome. First, we describe our recently developed machine learning approaches to high-throughput annotation of variants with functions related to protein-protein interactions. We then apply these approaches to the cancer genomics data in a comparative study of eight cancer types. Next, we introduce a new computational pipeline for the large-scale analysis of the alternative splicing-induced rewiring of the human interactome. We conclude with an application of this analysis to study autism spectrum disorder.

S04-04**THE ORPHANPRED – FUNCTIONAL EFFECT PREDICTION TOOL FOR
MUTATIONS ASSOCIATED WITH RARE DISEASES****Maxim V Ivanov, Kamil Khafizov, Sergey P Kovalenko*****Moscow Institute of Physics and Technology, Life Science Center, Dolgoprudny, Moscow region,
Russia***

The revolution in DNA sequencing technologies has resulted in an enormous growth of the number of gene sequences and mutations identified in them over the last several years. As next generation sequencing projects lead to generation of massive amounts of data, new computational tools for predicting the possible phenotypic effects of mutations are needed. In spite of the significant number of methods and tools that have been developed for this task, development of the field is more extensive rather than intensive – each new program uses the well-known algorithms and combines them in different ways. Thus, the effectiveness of such tools is expected to be rather limited, which is also discussed in a significant number of reviews. At the same time, the adjacent bioinformatics fields are developing much faster, although newly emerging methods still cannot find their applications in tools aimed at studying the phenotypic effects of the mutations. Here, we present a new program OrphanPRED that provides a new way to predict the functional effects of protein sequence variations. Besides the well-known methods of studying the conservation of mutations sites, sequence annotations and trivial geometric parameters of 3D structure of the protein, our tool also estimates the difference of free energy between wild type and mutant proteins. Binary classification of mutations is based on a score-function derived from the calculated descriptors using empirical rules. Our method was trained on a set of 1,521 mutations. On a selected test-subset (1,019 deleterious and 498 neutral mutations) the predictive ability of our method was shown to be higher than the corresponding abilities of widely used tools: accuracy is 80,6%, Matthews correlation coefficient - 0.61, area under the ROC curve - 0.878. Thereby, our program can significantly help to interpret the unknown-value variations and to narrow down the search space of possibly deleterious variants.

S04-05

THE MODELING OF REGULATORY MECHANISMS FOR MESC SELF-RENEWAL: KINETIC AND STOCHASTIC APPROACHES

Akberdin I.R., Ivanisenko N.V., Oschepkova E.A., Omelyanchuk N.A., Matushkin Yu.G., Afonnikov D.A., Kolchanov N.A.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The current experimental data supports the hypothesis that the Nanog-low state is a transient and reversible state that acts as a temporally restricted “gate-keeper” for extrinsic signals by which embryonic stem cells are directed towards differentiation. Therefore, the molecular control of Nanog levels has to be regarded as an important piece in the puzzle of pluripotency organization as it is a potential candidate mechanism to maintain the balance between self-renewal and differentiation. A detailed quantitative understanding of these processes and their consequences on the system dynamics would be highly beneficial for the development and the optimization of protocols for generation, maintaining and differentiation of induced pluripotent and embryonic stem cells. Nevertheless, existing models describing core genetic network regulation and Nanog heterogeneity have a number of drawbacks, as they do not include explicit molecular mechanisms of Nanog regulation based on the recent experimental data [Navarro et al., 2012]. Analysis of the kinetic and stochastic models describing the dynamics of the core gene network for maintenance of pluripotency and differentiation of embryonic stem cells is represented. The core gene network was modified according to the latest experimental data on the regulation of Nanog expression. Analysis of the kinetic model showed that in the dynamics of the concentration changes as Nanog mRNA and protein could potentially exist oscillating mode, which may explain the experimentally observed Nanog heterogeneity in stem cell populations. Stochastic approach, in turn, allowed us to reveal a range of parameters, in which there are two possible system states as the result of stochastic fluctuations: the high and low levels of expression of Oct4, Sox2 and Nanog. It is possible to accidentally switch from one state to another that may also be one of the mechanisms of the Nanog heterogeneity.

Acknowledgements: The work supported by SCSCR (Agreement with VIGG #8418-43/2013).

S04-06**THE RNA-SEQ BASED ALTERNATIVE SPLICING QUANTIFICATION****Gelfand¹, Mazin P.²**¹*IITP RAS, Moscow, Russia, ²Skoltech, Moscow, Russia*

RNA-seq based transcriptomics is actively used for genome-guided exon-intron gene structure reconstruction and mRNA abundance quantification. Most of available methods work on level of transcripts. Unfortunately, relatively short RNA-seq reads frequently cannot be unambiguously attributed to single transcript due to alternative splicing. Here we present a new, more suitable approach. We consider gene as a linked component in a splicing graph, where splicing sites constitute nodes, introns and exons (regions with continuous read coverage) form edges. Biconnected components in such graph corresponds to alternative splicing events. Counting reads that support different paths through splicing graph allows alternative splicing quantification. We developed SAJR: freely available program suite that allows gene prediction based on genomic sequences and aligned reads in bam/sam format. Additionally, SAJR could be used for gene expression and alternative splicing quantification. SAJR is available at <http://storage.bioinf.fbb.msu.ru/~mazin/>.

S04-07

THE GENOME-WIDE COMPARISON BETWEEN HUMAN ISOGENIC ESC AND IPSCS GENERATED OF DIFFERENT SOMATIC ORIGIN REVEALS DIVERSITY WITHIN COMMON FOR PLURIPOTENT STEM CELLS GENES/CPGS IN REPROGRAMMED CELLS

Мария Шутова¹, Анастасия Сурдина¹, Владимир Наумов², Дмитрий Ищенко², Екатерина Васина¹, Дмитрий Алексеев², Мария Лагарькова¹, Сергей Киселев¹

¹Институт Общей Генетики им Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, ²ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

Human induced pluripotent stem (hiPS) cells are a promising source of different types of patient-specific cells for future use in biomedicine. However, it remains controversial whether hiPSCs are molecularly indistinguishable from human embryonic stem (hES) cells, which serves as a standard for pluripotency. By comparing genetically identical human ES and iPSCs, we show that their expression (Illumina HT12v.4) and methylation (Illumina 450k) landscapes are quite similar. Different clones of hiPS cells showed a small number of iPSC-specific genes and CpGs, but all of them were either clone-specific or lab-specific and cannot be considered as a consequence of reprogramming process itself. Surprisingly, from the whole amount of genes and CpGs with non-ES-like state of expression or methylation in iPSCs on the late passages, only one-third had the same state on the early passages, whereas others are apparently the result of the fluctuations in the expression or methylation status of genes and CpGs with ES-like state established on the early passages. Interestingly, the number of genes or CpGs, which have the same level of expression or methylation between iPSCs types (derived from different parental lines: neurons, retinal pigmented epithelium, and fibroblast-like cells) and their isogenic ESC line is not more than 10% from the whole amount of such genes or CpGs observed in any of iPSC. That “core set” of genes and CpGs represent mostly the targets of Oct4, Sox2 and Nanog ESC specific transcription factors as well as of H3K27me3 and Polycomb. Functionally they represent the genes involved in regulation of mostly epithelial development. Genes related to mitosis and cell proliferation were found within more diverse set of genes with ES-like expression state observed in any pair of iPSC types. Thus, we could assume that the pluripotent state of newly developed hiPSCs is conservatively controlled by the acquisition of ES-like expression and methylation status of a small number of developmental and proliferative genes. Lean on these observations we’ve developed a universal protocol for effective selection of the best hiPSC clone in the cohort on the basis of their expression data on 275 “core set” genes, i.e. the clone, which would have the highest correlation with their own virtual isogenic hESC line.

Together, these data suggest that, on one hand, despite the minor transcriptional and epigenetical fluctuations hiPSCs are indistinguishable from hESCs and do not retain any specific markers of reprogramming, and, on the other hand, hiPSCs slightly differs from each other by their pluripotency state, which allows us to develop a protocol for choosing the best clone in the cohort.

S04-08**МЕТАFAST – ПРОГРАММНОЕ
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО
МЕТАГЕНОМОВ****СРЕДСТВО
СРАВНИТЕЛЬНОГО****ДЛЯ
АНАЛИЗА****Ульянцев В.И.¹, Казаков С.В.¹, Дубинкина В.Б.², Тяхт А.В.³, Алексеев Д.Г.³****¹Университет ИТМО. Санкт-Петербург, Россия, ²Московский Физико-Технический
Институт (Государственный Университет), ³НИИ Физико-Химической Медицины**

С развитием технологий высокопроизводительного секвенирования был накоплен огромный объем метагеномных данных. В методах метагеномного анализа ключевую роль играет получение сжатого представления (извлечение признаков) для эффективного сравнения метагеномов.

Для данных по полногеномному секвенированию микробиоты традиционные методы извлечения признаков используют либо картирование последовательностей, либо сборку *de novo*, которые требуют больших вычислительных затрат и трудноприменимы в случае метагеномов со сложным бактериальным составом (таких, как микробиота кишечника человека).

Нами было разработано программное средство *MetaFast* для сжатого представления метагеномов, не использующее априорное знание о микроорганизмах, которые могут содержаться в изучаемой среде. Преимущества подхода по сравнению с указанными аналогами – гибкость, скорость и экономия памяти. Алгоритм состоит из следующих этапов.

Выделение коротких геномных последовательностей из ридов для каждого метагенома на основе анализа графа де Брейна. Выделенные последовательности являются аналогами контигов, получаемых в результате сборки *de novo*, однако последовательности в разы короче.

Объединение последовательностей по всем метагеномам и выделение компонент связности в обобщенном графе де Брейна. При этом для больших компонент связности производится их итеративное разделение на подкомпоненты.

Построение вектора признаков для каждого метагенома путем подсчета суммарного числа вхождений *k*-меров из каждой компоненты в метагеном и объединения этих значений от всех компонент в вектор.

Попарное сравнение метагеномов путем расчета матрицы различия между ними на основе полученных векторов признаков с использованием индекса Брея-Кёртиса.

MetaFast способен за несколько часов работы кластера (6 TFLOPS) проанализировать и построить матрицу расстояний и кладограмму по ней между 150 метагеномами микробиоты кишечника человека (суммарно 700 Гб ридов), что на порядок быстрее методов картирования на референсный каталог геномов и сборки метагеномов *de novo*, а также требует меньше оперативной памяти, чем последний метод. Исходный код и исполняемый пакет *MetaFast* доступен по адресу <https://github.com/ulyantsev/metafast>.

S04-09

GAM: КОНВЕЙЕР ДЛЯ СОВМЕСТНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ТРАНСКРИПЦИОННОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФАЙЛИНГА

А. А. Сергушичев¹, Э. Пирс², М. Н. Артёмов²

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия, ²Университет Вашингтона в Сент-Луисе, Сент-Луис, США

С развитием технологий высокопроизводительного транскрипционного и метаболического профайлинга появляется необходимость в средствах для их совместной обработки. Данные от этих двух типов профайлинга обладают дополняющими друг друга характеристиками. С одной стороны, транскрипционные данные полны, а метаболические – нет: все экспрессированные гены определяются через RNA-seq, но отсутствие сигнала метаболита не означает его отсутствие в клетке. С другой стороны, метаболические данные соответствуют хорошо определенной сети биохимических реакций. В то же время, транскрипционные данные могут быть соотнесены с ферментами, регулирующими эти реакции. Таким образом, совместный анализ данных экспрессии генов и метаболитов в контексте сети химических реакций может позволить более полно рассмотреть регуляторную сеть клеток.

В этой работе представлен R-пакет GAM для совместного анализа транскрипционных и метаболических данных, а также веб-сервис, основанные на этом пакете (<https://artymovlab.wustl.edu/shiny/gam/>). Следует заметить, что даже в случае, когда доступен только один из этих типов данных, все равно возможно провести этот анализ. Таким образом, возможно, например, рассмотреть данные об экспрессии генов в контексте метаболической сети. Предлагаемый метод анализа состоит из трех шагов. Сначала общая сеть реакций подстраивается под имеющиеся данные удалением реакций без экспрессированных ферментов. Затем сеть реакций (включая бимолекулярные реакции) отображается в граф для возможности применения существующих алгоритмов анализа. На последнем шаге в сети находится наиболее регулируемая подсеть с помощью алгоритма BioNet.

Подход GAM был применен к анализу различий между LPS+IFN γ -стимулированными и нестимулированными мышинными макрофагами. Были найдены наиболее дифференциально экспрессированные модули, используя метаболические и транскрипционные данные как совместно, так и по отдельности. Можно отметить, что различия в регулировании цикла Кребса больше наблюдаются на метаболическом уровне, а цикл мочевины и синтез жирных кислот более заметны на транскрипционном уровне. Только совместное рассмотрение данных позволяет получить полную картину.

S04-10

THE UNIVERSAL Q-STATISTICS GOVERNING THE INTERNUCLEOTIDE INTERVALS: A SIGNATURE OF THE DNA STRUCTURAL OPTIMIZATION?

Mikhail Bogachev¹, Airat Kayumov², Oleg Markelov¹, Armin Bunde³

¹*Biomedical Engineering Research Center, Saint Petersburg State Electrotechnical University, 197376 Saint Petersburg, Russia,* ²*Department of Genetics, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, 420008 Kazan, Tatarstan, Russia,* ³*Institut fuer Theoretische Physik, Justus-Liebig-Universitaet Giessen, 35392 Giessen, Germany*

Uncovering the fundamental laws that govern the complex DNA structural organization remains challenging and is largely based upon reconstructions from the primary nucleotide sequences. We investigated the distributions of the internucleotide intervals and their persistence properties in genomes of various organisms from Prokaryotes to *H.sapiens* aiming to reveal the manifestation of the universal DNA architecture. In all genomes the distribution of internucleotide intervals l exhibit the same q -exponential form $A/\{1+(q-1)\beta(l/L)^{1/(q-1)}\}$ with $q=1.1\pm0.02$, $\beta=1.5$, $A=1.5$, where L is the average interval. While in prokaryotes a single q -exponential function makes the best fit, in eukaryotes the PDF contains additionally a second q -exponential with *exactly the same q value* and $\beta=0.1$. Remarkably, the sum of two q -exponentials in the human genome makes a perfect approximation over nearly 10 decades. Moderate deviations from this striking universality were observed in extremophile eukaryotes as well as in several water living eukaryotic organisms with environmentally dependent body temperature. We suggest that the universal q -exponential internucleotide distributions reflect the optimization of the DNA structure under the thermodynamical constraints associated with the DNA thermostability and the energy required for the DNA unwinding during replication and transcription while deviations from them is a signature of adaptation to the living environments with more pronounced thermodynamical constraints. This is further confirmed by the discrepancy between the distributions between strongly (G:C) and weakly (A:T) bounded base pairs where the second q -exponential appears a specific feature of strongly bonded nucleotides. Additionally the distribution between strongly bonded base pairs is characterized by a slightly larger q value than for the weakly bonded ones also in other genomes including both pro- and eukaryotes. Altogether, we suggest that the observed universality in the internucleotide distributions is a footprint of the heterogeneous DNA structure, where the first q -exponential reflects the universal helical pitch that appears both in pro- and eukaryotic DNA, while the second q -exponential is a specific marker of the large-scale eukaryotic DNA organization.

S04-11

THE INTRACELLULAR MOLECULAR MECHANISMS FOR HCV DRUG RESISTANCE EMERGENCE

Ivanisenko N.V.¹, Mischenko E.L.¹, Akberdin I.R.¹, Demenkov P.S.¹, Likhoshvai V.A.¹, Samsonov A.M.², Kozlov K.N.³, Todorov D.I.³, Gursky V.V.³, Samsonova M.G.³, Clausnitzer D.⁴, Kaderali L.⁴, Kolchanov N.A.¹, Ivanisenko V.A.¹

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*, ²*Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*, ³*St. Petersburg State Polytechnical University, St. Petersburg, Russia*, ⁴*Technische Universität Dresden, Dresden, Germany*

As an RNA virus, hepatitis C virus (HCV) is able to rapidly acquire drug resistance, and for this reason the design of effective anti-HCV drugs is a real challenge. The HCV subgenomic replicon-containing cells are widely used for experimental studies of the HCV genome replication mechanisms, for drug testing in vitro and in studies of HCV drug resistance. The NS3/4A protease is essential for virus replication and, therefore, it is one of the most attractive targets for developing specific antiviral agents against HCV. We have developed a stochastic model of subgenomic HCV replicon replication, in which the emergence and selection of drug resistant mutant viral RNAs in replicon cells is taken into account. Incorporation into the model of key NS3 protease mutations leading to resistance to BILN-2061 (A156T, D168V, R155Q), VX-950 (A156S, A156T, T54A) and SCH 503034 (A156T, A156S, T54A) inhibitors allows us to describe two-phase long term dynamics of the viral RNA suppression for various inhibitor concentrations. The model can be used to interpret the results of anti-HCV drug testing on replicon systems, as well as to estimate the efficacy of potential drugs and predict optimal schemes of their usage.

S04-12

THE IDENTIFICATION OF SMALL OPEN READING FRAMES WITH HIGH CODING POTENTIAL IN MOSS *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Arapidi G.P.¹, Fesenko I.A.¹, Babalyan K.A.², Seredina A.V.¹, Khazigaleeva R.A.¹, Kostrukova E.S.³, Kovalchuk S.I.¹, Anikanov N.A.¹, Semashko T.A.³, Govorun V.M.³, Ivanov V.T.¹

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;* ²*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudy, Russia;* ³*Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow, Russia*

It has been revealed that small open reading frames (sORFs, up to 100 codons) have the potential to encode biologically active peptides that have regulatory roles in eukaryotic cells (Kastenmayer et al., 2006), (Kondo et al., 2010), (Andrews et al., 2014). In plants, a number of peptides encoded by sORFs play significant roles in various aspects of plant growth and development (Hanada et al., 2012). However, most *ab initio* gene prediction programs are not well suited for identifying sORFs with coding potential. Moreover, existing standard proteomic approaches poorly suited for the identification of proteins less than 10 kDa. This led to a lack of information about sORFs for many model organisms.

We developed an approach that allows with high confidence to predict sORFs, and validate them at the level of transcriptome and peptidome. We used prediction program sORFinder (Hanada et al., 2010) to find intergenic regions with high coding potential in the genome of the model object moss *Physcomitrella patens*. High-throughput RNA-Seq by SOLiD 4 genetic analyzer (Life Technologies, Applied Biosystems) and identification of native peptides by TripleTOF 5600 LC-MS/MS (ABSciex) has been carried out on gametophore, protonema and protoplast cells of *Physcomitrella patens*.

Using sORFinder we distinguished 241,228 sORFs within intergenic region with high coding potential. RNA-Seq confirmed transcription of 8,450 sORFs from intergenic region and 16,928 previously known genes of *Physcomitrella patens*. Tandem mass-spectrometry analysis resulted in identification of 34 unique peptides derived from 27 sORFs within intergenic region, 68 peptides derived from 30 sORFs that were previously thought to be untranslated region of mRNAs and 94 peptides from 87 alternative sORFs within previously known ORFs.

Comparative analyses of sORFs sequences distinguished in moss *Physcomitrella patens* with genomes of other plant species revealed high conservation in terms of synonymous/nonsynonymous substitutions. The report will be discussed further steps to validate the results: overexpression and knockout mutants of coding sORFs, functional categorization and expression under stress.

S04-13

БАЗА ДАННЫХ ПО ЯДРАМ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ЯДЕР СВОРАЧИВАНИЯ

Марченко Наталья Юрьевна, Гарбузинский Сергей Александрович

Институт белка РАН. Пуццо, Россия

Ключевым этапом самоорганизации белка является формирование ядра сворачивания (участка нативной структуры, который уже структурирован в переходном состоянии на пути сворачивания).

Нами составлена база данных по белкам с экспериментально исследованными ядрами сворачивания. На данный момент в нашей базе собрано более 50 различных белков дикого типа и для каждого - в среднем около 15 мутантных форм; таким образом, в базе представлено более 750 вариантов белков.

С помощью разработанных нами методов предсказания ядер сворачивания мы предсказали положение ядер сворачивания в белках из составленной базы. Получено хорошее совпадение предсказаний с экспериментальными данными, что указывает на успешность разработанных методов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№13-04-00253-А и № 14-04-01554-А), гранта МОН РК и Программы "Молекулярная и клеточная биология" (01200957492) Президиума РАН.

S04-14**АЛГОРИТМ ПОИСКА АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ****Ищенко Дмитрий Станиславович, Алексеев Дмитрий Глебович*****НИИ ФХМ, Москва, Россия***

В настоящее время при анализе масс-спектрометрических данных используется подход с поиском спектров по теоретическим спектральным базам данных (MASCOT, SEQUEST). Из известных аминокислотных последовательностей по заданным правилам создаются теоретические спектры, а также вводится функция схожести экспериментальных и теоретических спектров (с учетом вероятностных правил). Особенностью вышеизложенного метода является тот факт, что он позволяет определять лишь те последовательности, которые были использованы при создании теоретической спектральной базы данных.

Нами был разработан и описан новый подход к анализу масс-спектрометрических данных, позволяющий идентифицировать спектры с точностью до одно- и двузаменных аминокислотных отличий. В основу метода заложен алгоритм сдвига пиков, а также векторное представление масс-спектрометрических данных, позволяющее учитывать значения интенсивностей пиков. Алгоритм реализован в виде приложения на языке C++.

S04-15

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Шашкова Т.И.¹, Ищенко Д.С.², Тяхт А.В.², Алексеев Д.Г.²

¹МФТИ (ГУ), Долгопрудный, Россия, ²ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

Микробиота кишечника – сложная комплексная система, состоящая из множества компонент. Компоненты взаимодействуют между собой при помощи различных механизмов. Например, бактерии могут объединяться в сообщества или конкурировать друг с другом за ресурсы, кишечник выделяет питательные вещества для одних бактерий и токсины для других, контролируя численность и состав микробиоты.

Для изучения поведения системы и проверки предположений о взаимодействиях компонент микробиоты мы используем подход агентного моделирования. На основе литературных данных построена упрощенная модель микробиоты кишечника. Модель описывает взаимодействие двух бактериальных видов. Бактерии обладают рядом функций: поиск еды, передвижение, преобразование еды в соответствующие вещества, деление. Они взаимодействуют друг с другом и с кишечником. Бактерии участвуют в процессе метаболизма полисахаридов в КЖК. Поведение каждой бактерии моделируется отдельно и зависит от локальных условий среды и ее окружения. На данный момент найдены наборы параметров, при которых система находится в стационарном состоянии. Дальнейшее изучение параметров системы и ее усложнение будет приближать модель к реальности и в результате можно получить модель, на основе которой будет возможно предсказываться состав микробиоты. Зная отклонение состава микробиоты в случае болезни от нормального состояния, можно будет моделировать различные варианты его нормализации, и находить наиболее подходящие методы лечения.

S04-16**ПРОТЕОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОВ**

Алтухов Илья Алексеевич¹, Ищенко Дмитрий Станиславович¹, Манолов Александр Иванович², Алексеев Дмитрий Глебович²

¹Московский Физико-Технический Институт (ГУ), ²ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России

МАЛДИ масс-спектр бактерии представляет собой набор пиков, отражающих наиболее представленные белки в микроорганизме, и является уникальным для данного организма, как отпечатки пальцев. В данной работе мы провели анализ более 2000 масс-спектров для более чем 300 бактериальных видов. В ходе работы мы продемонстрировали встречаемость пиков и ортогональных групп белков среди масс-спектров, что показывает уникальность пиков масс-спектра среди спектров других организмов. Кроме того нами был проведен сравнительный филогенетический (по геномным данным) и спектральный (по МАЛДИ масс-спектрам) анализ, позволяющий ответить на вопросы влияния геномного разнообразия близкородственных микроорганизмов на их масс-спектр.

В ходе данной работы мы разработали программный подход, позволяющий производить корреляционный анализ, идентифицировать отличия между спектрами близкородственных организмов и изменения спектральных профилей в зависимости от условий культивации микроорганизмов.

S04-17

THE GRAPH DATABASE FOR MOLECULAR BIOLOGY: ADVANTAGES OF THE GRAPH REPRESENTATION OF DATA

Temlyakova E.A.¹, Ryasik A.A.¹, Sergeev A.V.², Sorokin A.A.¹

¹*Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russia*, ²*Institute of Mathematical Problems of Biology RAS, Pushchino, Russia*

The ever increasing pace of biological data acquisition caused by the rapid development of high-throughput experimental techniques makes the data integration a key task of the modern bioinformatics and computational biology. At the moment there are a great number of knowledge-, organism- and data-specific databases that store information about a particular organism, types of reactions, molecular mechanisms and objects, results of particular type of experiments, etc. The integration of all that data under the common roof is a challenging task for a number of reasons [1-2]. For example most of that data are stored in tabular form either in local files or in relational databases while, many aspects of modern biology and medicine are naturally mapped to a graph or network structures. Another example is a mismatch in the data structures, when two databases represent the same biological object differently.

We have constructed a prototype of graph database for molecular biology data. It contains information about *Escherichia coli* genome, proteome, metabolome, transcriptional and translational regulation, etc. The information is obtained from major authoritative well-known databases (UniProt, GenBank, RegulonDB, etc). All the data are stored as a one colored attributed graph [3] with molecular objects as nodes with predetermined types of relations and object-specific properties. Data from different sources could be stored in different nodes connected to each other, which let end user (not the database designer) to decide which data source have to be used. Graph representation of molecular biology data provides new opportunities for queering database, information retrieval and analyzing patterns in data.

Acknowledgements: This work was supported by RFBR grant 14-04-31793 mol_a.

References:

- Smith, R.N. et al. Bioinformatics (Oxford, England), 2012, 28(23), 3163–3165.
- Balakrishnan, R. et al. Database: The Journal of Biological Databases and Curation, 2012., doi: 10.1093/database/bar062
- Neo4j web-site (Neo Technology): <http://www.neo4j.org/>

S04-18**GENOMIC ANALYSIS OF OIL SLUDGE MICROBIOTA****Alexandra Kanygina¹, Alexander Manolov², Tatyana Grigoryeva³, Dmitry Alexeev²****¹Moscow Institute of Physics and Technology. Moscow, Russia, ²Research Institute of Physical and Chemical Medicine. Moscow, Russia, ³Kazan Federal University. Kazan, Russia**

In recent years, the problem of industrial waste treatment has become essential. The recycling of oil refining wastes is a subject of great interest because these compounds decompose very slowly and are highly toxic and thus dangerous to the environment.

We studied an industrial oil sludge sample in order to investigate its microbial diversity. Genome-wide analysis of *P. stutzeri* strain KOS6, which is the major representative of the sludge cultivated bacteria, has shown that *P. stutzeri* KOS6 genome contains an unusual combination of genetic traits. These include the genes associated with nitrogen fixation system (*nif* operon) and naphthalene degradation system (*nah* operon). The functioning of the *nah* system was observed by proteomic analysis under sucrose-free conditions with naphthalene being the sole carbon and energy source.

We performed a comparative genomic analysis of *P. stutzeri* KOS6 and 14 *P. stutzeri* strains available from NCBI. It has shown that the KOS6 genome contains a 122,000-bp region likely to have been acquired by horizontal gene transfer from *T. auensis*. This region includes *phaA* and *phaC* genes responsible for polyhydroxialkanoates (PHA) synthesis. Finally, a phylogenetic tree of *P. stutzeri* strains was constructed using maximum likelihood estimation (MLE).

S04-19

ИССЛЕДОВАНИЕ ГРАНИЦ ПРИМЕНИМОСТИ К-МЕРНОГО ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Дубинкина Вероника¹, Тяхт Александр², Алексеев Дмитрий²

¹Московский Физико-Технический Институт (ГУ), Долгопрудный, Россия, ²ФГБУН НИИ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Сравнение последовательностей играет ключевую роль в различных видах анализа данных секвенирования. С развитием технологий NGS секвенирования появилось огромное количество метагеномных данных, которые необходимо анализировать быстро и эффективно. Среди методов анализа геномных данных, в последнее время все больше интереса вызывает способ сравнения последовательностей без выравнивания, основанный на работе с k -мерами (олигонуклеотидами длины k). Подход является высокоэффективным для первичного анализа больших массивов данных, так как требует меньшего количества промежуточных вычислений по сравнению с другими методами и не зависит от сравнения с референсом.

Обычно анализируется k -мерный спектр (вектор частот встречаемости каждого k -мера в данных). Этот метод хорошо показал себя для задач таксономического разделения организмов и кластеризации простых метагеномных данных, так как метагеномы могут содержать организмы, чьи геномы не представлены в референсных базах данных, и содержащиеся в них геномы могут быть отсекарованы с различным покрытием, что делает стандартные методы, такие как сборка, трудноприменимыми.

Однако для таких сложных метагеномов, как кишечный, эти методы пока не достаточно разработаны и поэтому целью нашей работы было исследовать границы применимости метода и k -мерное пространство метагеномов. Для базы данных из 339 образцов кишечных метагеномов, секвенированных на платформе Illumina, в ходе крупнейших мировых проектов [1, 2, 3], был проведен описательный анализ при различных значениях k и сравнение k -мерного и бактериального составов. На симулированных и экспериментальных данных проводилась оценка вклада в сходство k -мерного и бактериального состава различных факторов. Были выработаны рекомендации по применению k -мерного метода для анализа данных для метагенома кишечника человека.

[1] Qin et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. — 2010, p. 59-65.

[2] Qin et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature 490. - 2012, p. 55-60.

[3] Mitreva et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486. - 2012, p. 207–214.

S04-20**ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКА ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗА I (COI) В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРНОГО ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ ЗООПЛАНКТОННЫХ ОРГАНИЗМОВ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ****Фролова Людмила Леонидовна, Хусаинов Артур Маратович*****Казанский (Приволжский) Федеральный университет. Казань, Россия***

В современном мире водные объекты, расположенные в крупных городах испытывают сильную антропогенную нагрузку. Поэтому быстрый и своевременный мониторинг водоемов очень актуален. В наши дни биоиндикация зоопланктона является одним из основных методов оценки состояния водоемов. Метод заключается в определении зоопланктона по морфологическим признакам под микроскопом и мнение исследователя может быть субъективным, так как для идентификации некоторых видов необходимы знания узких специалистов потому, что некоторым видам присущ сильный половой деморфизм, или наоборот, существуют виды двойники. Мы решили разработать объективный метод при помощи биоинформатики и молекулярной биологии, который позволит достоверно и в короткие сроки оценить состояние водоема.

В настоящее время ученые используют участок митохондриального гена COI в определении таксономии организмов, но не используют для оценки экологического состояния водоемов методом биоиндикации. Такой подход повышает достоверность и увеличивает скорость определения зоопланктона, но очень дорого обходится потому, что из пробы можно определять только по одному организму предварительно отделив их друг от друга, следовательно некоторые организмы будут встречаться в нескольких экземплярах, а так же для выполнения требует специальных лабораторий.

Убедившись, что ген COI можно использовать как маркерный для идентификации организмов можно предположить, что продукт этого гена тоже является маркерным для идентификации видов, а использование белка позволит работать с совокупностью организмов из одной пробы. Для этого была разработана эколого-генетическая база данных «Экобелок», которая содержит 261 индикаторный вид (В. Сладечек, 1973) зоопланктонных организмов обитающих в водоемах на территории г. Казани с сапробностями и индикаторными весами, аминокислотными последовательностями белков из международной базы данных GenPept: COI 95 организмов с указанием размеров организмов. Был проведен анализ и множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка COI, а так же анализ и 3D моделирование белков COI зоопланктонных организмов.

В результате показано наличие 36 уникальных вариабельных участков белка COI двадцати трех зоопланктонных организмов, для которых можно создать антитела и по ним распознать вид организма. Поэтому белок COI можно рассматривать в качестве маркерного для идентификации вида зоопланктона.

S04-21

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ НАФТАЛИНОВОГО ОПЕРОНА СРЕДИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS STUTZERI*

Булыгина Е.А., Григорьева Т.В., Лайков А.В.

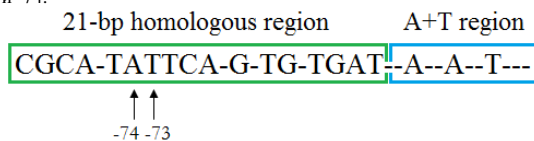
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Впервые генетика и регуляция деградации нафталена была изучена на примере плазмиды NAH7 *Pseudomonas putida* [1]. Нафталиновый катаболизм *P. putida* определяется работой двух оперонов, верхнего и нижнего, находящихся под регуляцией гена *nahR* (семейство регуляторов транскрипции LysR), активируемого салицилатом. Для некоторых штаммов *Pseudomonas stutzeri* также описана способность к деградации нафталена, связанная с горизонтальным переносом и интеграцией в геном данного оперона, однако особенности реализации этой системы у *P. stutzeri* изучены недостаточно [2].

Объектом исследования является штамм *P. stutzeri* KOS6, выделенный как деструктор нафталена из нефтешлама [3]. Его полногеномное секвенирование позволило установить наличие обоих оперонов. Сравнительный анализ с полногеномными последовательностями других штаммов *P. stutzeri* показал, что *nah*-система фланкирована генами интеграз и имеет наибольшую гомологию с плазмидой NAH7 *P. putida*.

Вопреки ожиданиям, протеомный анализ штамма KOS6 при выращивании культуры на минеральной среде с нафталином или глюкозой в качестве единственного источника углерода и энергии обнаружил наличие всех ключевых белков верхнего и нижнего путей деградации нафталена независимо от условий культивирования, поэтому был проведен подробный анализ регуляторных областей *nah*-оперона.

BLASTp последовательности *nahR* KOS6 выявил совпадение со 100% идентичностью со следующими нафталин-деградирующими штаммами: *P. stutzeri* CCUG29243, *P. stutzeri* B1SMN1 и *P. putida* CSV86. На основе описанной для NAH7 последовательности сайта связывания NahR с промоторами P_{nah} и P_{sal} было проведено его выравнивание против *P. stutzeri* KOS6 [4]. Участки для выравнивания в случае верхнего пути находятся между *nahAa* и геном интегразы, в случае нижнего – между салицилат гидроксилазой *nahG* и регулятором *lysR*. Последовательности P_{nah} и P_{sal} гомологичны, причем на специфическое узнавание и образование связи влияют только 2 нуклеотида: -73 и -74.



И в P_{nah}, и P_{sal} промоторе оба нуклеотида совпадают с референсными.

P_{nah}:

P_{sal}:

У других штаммов *P. stutzeri* – CCUG 29243, B1SMN1, и у *P. putida* CSV86 также обнаруживается гомологичная референсной последовательность промоторов.

Таким образом, анализ регуляции системы нафталиновой деградации *P. stutzeri* не обнаружил нуклеотидных замен в регуляторных областях, однако, протеомный анализ свидетельствует о возможной альтернативной реализации данной системы и требует дополнительных исследований.

Schell M. A. Transcriptional control of the *nah* and *sal* hydrocarbon-degradation operons by the *nahR* gene product //Gene. – 1985. – Т. 36. – №. 3. – С. 301-309

Rosselló-Mora R. A., Lalucat J., García-Valdés E. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains //Applied and environmental microbiology. – 1994. – Т. 60. – №. 3. – С. 966-972.

Grigoryeva T. V. et al. Draft genome of the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain KOS6 isolated from industrial hydrocarbon sludge //Genome announcements. – 2013. – Т. 1. – №. 1. – С. e00072-12.

Schell M. A., Poser E. F. Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to nah and sal promoters //Journal of bacteriology. – 1989. – Т. 171. – №. 2. – С. 837-846.

S04-22**МЕТОД ПРЕДСКАЗАНИЯ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ТИПОВ КЛЕТОК В ОБРАЗЦАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА****Иголкина А.А., Самсонова М.Г.*****СПбГПУ, Санкт-Петербург, Россия***

Кровь – наиболее исследованная гетерогенная ткань. Данные по экспрессии генов в образцах крови человека широко используются в медицинской диагностике. Однако такие данные могут быть искажены из-за неоднородности образца. Применение экспериментальных методов для разделения или количественного подсчета типов клеток в образце трудоемко и затратно. Привлекательной альтернативой является точная деконволюция данных экспрессии генов. В работе мы разработали способ предсказания процентного содержания отдельных типов клеток в образце крови по данным полногеномной экспрессии генов.

Мы использовали данные 2000 пациентов с известными уровнями экспрессии генов и процентным содержанием пяти типов клеток. Образцы были разделены на обучающую и тестовую выборки. Мы построили и протестировали различные предсказательные модели: основанные на методе главных компонент, линейной регрессии и SVM с различными типами ядерных функций. Были использованы следующие процедуры отбора признаков: эвристический выбор, фильтрующие процедуры, RFE метод и априорную информацию о маркерных генах для отдельных типов клеток. Предсказательные способности подходов были оценены с помощью коэффициента корреляции Пирсона между предсказаниями и данными.

Наилучшую предсказательную способность показала линейная модель с использованием эвристического метода отбора признаков: корреляции Пирсона между предсказаниями и данными: 0.8-0.95. Такие результаты позволяют использовать разработанную модель в дальнейших исследованиях.

S04-23**КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАЕКТОРИЙ ДВИЖЕНИЯ ЧАСТИЦ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ****Писарев А.С., Самсонова М.Г.****СПбГПУ, Санкт-Петербург**

Внутреннее пространство клетки наполнено различными органеллами и полимерными структурами, функционирующими как единая система, связанная посредством молекулярного транспорта. Мы изучали механизмы этого процесса, анализируя движение вирусных частиц в клетках инфицированных вирусом гепатита С, а также транспорт эндосом в клетках HeLa. Разработана система автоматического трекинга траекторий движения частиц вируса и эндосом по видеоизображениям живых клеток и получены обобщенные статистические данные об этих траекториях.

Показано, что длина треков и время активного движения (время жизни) частиц вируса гепатита и эндосом распределены по логнормальному закону. Разработан метод моделирования треков частиц на основе метода Монте-Карло и метода анализа квадрата средних по ансамблю смещений (EA-MSD). Показано что реконструированные по модели треки движения хорошо согласуются с экспериментальными данными. Мы использовали модель для реконструкции видеоизображений с различным числом (от нескольких десятков до нескольких тысяч) траекторий.

Реконструированные видеоизображения, для которых были известны заданные модельные траектории, были применены для оценки точности и производительности алгоритмов трекинга частиц, а также для выбора настроек параметров алгоритмов.

Параметры настроек для алгоритмов трекинга в дальнейшем были применены для обработки аналогичных видеоизображений.

Применение обобщенных результатов анализа экспериментальных данных и уточнение параметров настройки алгоритмов трекинга с использованием моделей позволяет получать более точные решения в условиях неопределенности на основе видеоизображений живых клеток.

Методы анализа и моделирования траекторий частиц реализованы на языке программирования java в системе автоматического трекинга с применением многоагентного подхода и облачных технологий для повышения доступности и снижения затрат.

S04-24**АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ G-КВАДРУПЛЕКСОВ В ГЕНОМАХ ЭУКАРИОТ****Позмогова Г.Е., Ищенко Д.С., Генерозов Э.В., Варижук А.М., Наумов В.А.****ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия**

Изучение неканонических структур ДНК, таких как G-квадруплексы, представляет большой интерес в связи с их возможной ролью в регуляции работы геномов. Для оценки конформационного потенциала геномов различных эукариот важно провести сравнительный анализ распределения сайтов, способных сформировать совершенные (GQ) и/или несовершенные (ImGQ, несущие единичные замены в G-тетрадах) G-квадруплексы.

Для этого был создан улучшенный алгоритм поиска в геномах GQ и ImGQ сайтов (imGQfinder.niifhm.ru/), а также алгоритм подбора последовательностей, аналогичных квадруплексам по GC-составу и длине, но не несущих в себе квадруплексного мотива.

В результате были получены и проанализированы данные о распределении наиболее стабильных в физиологических условиях GQ и ImGQ вблизи экзонов, интронов и сайтов альтернативного сплайсинга в геномах *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Macacae rhesus*.

При поддержке гранта РФФИ [14-25-00013].

S04-25**ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПРОТЕИНАЗА *PROTEUS MIRABILIS*: ПОИСК ГОМОЛОГОВ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСИНТЕЗА**

Замалютдинова Наиля Марсовна, Гилязева Аделия Гаделевна, Марданова Айслу Миркасымовна, Миннуллина Лейла Фарвазовна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии

Proteus mirabilis, условно-патогенная грамотрицательная бактерия семейства *Enterobacteriaceae* – возбудитель оппортунистических и госпитальных инфекций. Чаще всего *P. mirabilis* является причиной инфекций мочевыводящих путей. Один из факторов вирулентности этих бактерий – внеклеточная металлопротеиназа, ген которой (*zapA*) входит в состав оперона, включающего в себя гены, кодирующие АТФ-зависимую транспортную систему. *ZapA* протеиназа относится к семейству серрализинов.

Нами проведен биоинформационный анализ секвенированных бактериальных геномов с целью поиска генов-гомологов *ZapA* протеиназы *P. mirabilis*. Биоинформационный анализ проводили с помощью программ базы данных NCBI и Asap. Обнаружены ортологи в геномах разных видов энтеробактерий (р. *Serratia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Yersinia* др.). Однако степень гомологии генов невысока. Так при длине гена *zapA* в 1476 н.о. (белок 491 а.о.) в геноме *Serratia proteamaculans* обнаружен участок 67% гомологии в пределах 563 н.о. При этом идентичность белков составляет 51%.

Исследовали биосинтез металлопротеиназы клиническим изолятом *P. mirabilis* 5127-1 на разных средах и влияние на биосинтез глюкозы, мочевины и 2'-бипиридила. Синтез протеиназы полностью подавляется при росте бактерий на синтетических средах, а также в присутствии в среде LB глюкозы. Показали, что добавление в среду мочевины приводит к увеличению продуктивности протеиназы. Максимальная продуктивность культуры по протеиназе обнаружена на среде с натуральной мочой. При росте бактерий на искусственной моче протеиназа появлялась в среде только после 12 ч роста в виде одной изоформы. Связывание свободного железа в среде бипиридиллом ингибирует рост *P. mirabilis* на среде LB, но приводит к увеличению продуктивности внеклеточной протеиназы. Также установили, что недостаток свободного железа в среде влияет на устойчивость бактерии к антибиотикам. Присутствие мочевины и низкая концентрация свободного железа в среде являются одними из факторов, влияющих на индукцию биосинтеза внеклеточной металлопротеиназы *P. mirabilis*.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ и Правительства РТ (проект №13-04-97130) и средств субсидии, выделенной для выполнения государственного задания (проект № 14-83).

S04-26

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ОБЕЗВОЖИВАНИЮ В КОМАРАХ-ЗВОНЦАХ *CHIRONOMIDAE*

О. Козлова¹, Й. Суетцгу², Т. Кикавада², М. Логачёва³, А. Кондрашов³, О. Гусев¹

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет. Казань, Россия, ²National Institute of Agrobiological Sciences. Tsukuba, Japan, ³Московский Государственный Университет. Москва, Россия

Известно, что личинки некоторых видов комаров-звонцов отличаются способностью успешно противостоять обезвоживанию. Одними из самых приспособленных к экстремальному существованию в условиях недостатка воды насекомых этой группы являются виды *Polypedilum vanderplanki* (Африка) и *Paraborniola tonnoiri* (Австралия). Однако механизмы выживания при частичном обезвоживании у данных видов различны: если в случае *P. vanderplanki* имеет место криптобиоз, выраженный в высыхании и прекращении жизненных функций личинки, то личинка комара-звонца *P. tonnoiri* действует по стратегии гипометаболизма, замедляя свои внутренние процессы и потребляя минимум запасённой влаги.

С целью детального понимания и сравнения молекулярно-генетических механизмов, действующих в личинках комаров-звонцов *P. vanderplanki* и *P. tonnoiri*, нами был проведён полногеномный анализ экспрессии мРНК в контрольных и подвергнутых частичному обезвоживанию группах личинок данных видов. В результате анализа дифференциальной экспрессии, проведённого для личинок *P. tonnoiri*, было выявлено 1459 моделей генов, повышающих свою экспрессию при обезвоживании, и 195 моделей генов с понижающейся экспрессией. Анализ насыщения группами генов с дифференциальной экспрессией известных биохимических путей, а также сравнение полученной информации с данными по *P. vanderplanki* показал, что личинки комаров-звонцов *P. vanderplanki* и *P. tonnoiri* используют разные молекулярно-генетические механизмы адаптации к обезвоживанию.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 12-08-33157 мол_а_вед и 14-04-01657 А.

S04-27**АЛГОРИТМ СБОРКИ ТРАНСКРИПТОМА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА КОМПОНЕНТ СВЯЗНОСТИ ГРАФА ДЕ БРЁЙНА****Долганов В.О., Царев Ф.Н.****Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия**

Технологии секвенирования позволили получать информацию о транскриптомах организмов. Знание транскриптома помогает в анализе экспрессии генов, открытии новых изоформ транскриптов и множестве других задач.

После работы секвенатора на выходе получаются чтения. Чтения бывают разного качества и различных видов. Одним из видов чтений являются парные чтения. Такие чтения содержат начала и концы различных участков транскриптов. Стоимость запуска секвенатора, выдающего парные чтения, меньше, чем секвенатора, выдающего полные чтения. Поэтому данная техника широко распространена. Задачей сборки транскриптома является восстановление исходных транскриптов по чтениям.

В случае отсутствия референса, используется сборка *de novo*. При такой сборке используются только чтения без дополнительной информации. Такая сборка является менее точной, но не требует информации об организме. Нами было разработано программное средство для *de novo* сборки транскриптома по парным чтениям. Преимущества подхода по сравнению с аналогами – скорость и экономия памяти. Алгоритм состоит из следующих этапов: 1. Анализ начальных чтений. Сбор информации о частоте k-меров, фильтрация ошибочных k-меров. 2. Построение графа де Брёйна и выделение в нем компонент связности без учета ориентации рёбер. 3. Разбиение больших компонент связности путем удаления из них ошибочных рёбер. Ошибочные рёбра определялись на основе информации о частоте k-меров соответствующих вершин. 4. Независимый анализ каждой полученной компоненты и выделение из них транскриптов. Выделение транскриптов основано на поиске путей в компоненте. При поиске путей так же учитывалась информация о частоте k-меров.

Разработанный алгоритм был реализован на языке программирования Java и сравнён с одним из популярных сборщиков транскриптома Trinity на различных данных. Во всех экспериментах предложенный метод работал в несколько раз быстрее и требовал меньшее количество памяти. Качество сборки предложенного метода зачастую уступало качеству сборки Trinity. В ряде случаев предложенный метод восстановил большее количество информации. Таким образом, предложенный метод может быть использован для быстрого получения предварительной сборки на системе с небольшим объемом памяти.

S05-01**ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЛИНИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ ЭМБРИОНЕ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ РАЗВИТИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ И РОСТОВЫМИ ФАКТОРАМИ.****Рыбцов С., Иванов А., Ляховицкая А., Фаннинг Н., Медвинский А.*****Шотландский Центр Регенеративной Медицины, Эдинбургский Университет, Великобритания.***

Исследование развития гематопоэтических стволовых клеток (ГСК) в раннем эмбрионе позволяет понять механизмы патологий гематопоэтической системы и создать методы получения ГСК *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Мы обнаружили экстраординарный регенеративный потенциал ГСК, изолированных из раннего человеческого эмбриона. Каждая такая ГСК производит от 600 до 1000 ГСК взрослого типа и способна восстановить весь репертуар взрослой гематопоэтической системы. Развитие ГСК в раннем эмбрионе связывают с так называемым эндотелиально-гематопоэтическим транзитом (ЭГТ), регулируемым геном Runx1, нокаут которого прерывает развития ГСК. Используя новый *ex vivo* культуральный протокол и мышиную модель Runx1, реактивируемую под CD41-Cre, мы показали, что Runx1 важен после ЭГТ, но до спецификации ГСК на стадии нерепопулирующих гематопоэтических предшественников (про-ГСК, пре-ГСК I и II типов). Все три предшественника экспрессируют c-Kit, VE-cadherin и CD41, но различаются по экспрессии CD43 и CD45. Секреция фактора стволовых клеток (SCF) вентральной нишей дорзальной аорты инициирует, через c-Kit рецептор, развитие линии ГСК из про-ГСК. В то время как IL-3 факультативен и работает только на последней стадии развития ГСК. Новый протокол позволяет без генетических манипуляций получить низко репопулирующие трансплантируемые ГСК из ЭСК мыши *in vitro*. Для получения ГСК из ЭСК человека *in vitro* требуются дальнейшие исследования по взаимодействию как минимум двух сигнально-регуляторных путей: c-Kit и Runx1.

S05-02**ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕПРОГРАММИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА****Некрасов Е. Д.*****Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук. Москва, Россия***

Болезнь Гентингтона является неизлечимым наследственным нейродегенеративным заболеванием с аутосомно-доминантным типом наследования. Распространенность болезни Гентингтона в странах Западной и Восточной Европы, США, Канаде 3-7 случаев на 100000 населения. Болезнь обычно начинается в возрасте 35-50 лет и неминуемо приводит к смерти. На клеточном уровне болезнь характеризуется прогрессирующей гибелью ГАМК-эргических нейронов стриатума. Молекулярные механизмы болезни Гентингтона в значительной мере не изучены. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) получают из соматических клеток пациентов, они способны неограниченно расти в культуре и дифференцироваться во все типы клеток. Технологии ИПСК позволяют преодолеть проблему ограниченного доступа исследователей к мутантным человеческим ГАМК-эргическим нейронам стриатума. Такие нейроны могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов болезни Гентингтона и поиска новых лекарств. Нами были получены ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона. Был разработан эффективный протокол дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в ГАМК-эргические нейроны стриатума. С использованием дифференцированных нейронов, был проведен поиск фенотипических различий между нейронами мутантными и дикого типа. В результате проведенных исследований нами был обнаружен целый ряд фенотипических различий, связанных кальциевыми сигнальными путями.

S05-03**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНУ КАИЗО НА РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ
МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ****Шумская В.С., Жигалова Н.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б.*****Учреждение Российской академии наук Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия***

В настоящее время внимание большинства учёных направлено на изучение генетических и эпигенетических изменений, происходящих при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток.

Каизо относится к ВТВ/POZ семейству транскрипционных факторов и связывает метилированные CpG динуклеотиды. Генетический нокаут Каизо не приводит к ярко выраженному фенотипу у мышей, они остаются фертильными и здоровыми. Тем не менее, нами было показано, что из мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ), лишенных гена Каизо, получается гораздо большее количество ИПСК и они являются более совершенными по сравнению с ИПСК, полученными от МЭФ дикого типа.

Для получения репрограммированных колоний ИПСК, использовалось 2 подхода:

1. при помощи инфицирования клеток МЭФ дикого типа C57BL/6 (WT) и нокаутных по Каизо C57BL/6/Kaiso (KO) лентевирусами, несущими факторы Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc).
2. путем активации доксициклинзависимого локуса с факторами Яманаки в клетках МЭФ, полученных от линии мышей C56BL/6/4F2A (WT/4F2A) и C57BL/6Kaiso/4F2A (KO/4F2A).

Мы показали, что формирование ИПСК при заражении МЭФ лентевирусами с факторами Яманаки происходит значительно активнее в КО клетках, чем в клетках WT (Рис. 1).

Для того, чтобы подтвердить результаты и исключить возможности интерференции лентивирусов эндогенными факторами при трансфекции вирусами, и получения однородной культуры ИПСК, использовались трансгенные мышинные модели дикого типа (WT/4F2A) и нокаута по Каизо (KO/4F2A) для репрограммирования соматических клеток путём экспрессии четырёх факторов плюрипотентности (Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc) с одного геномного локуса, путём активации доксициклинзависимой кассеты (4F2A).

Также как и в ИПСК, полученных путем заражения лентивирусами, в индуцибельной доксициклином системе из мышинных эмбриональных фибробластов KO/4F2A образовалось больше колоний ИПСК. В то же время, гораздо меньшее число колоний наблюдалось в клетках WT/4F2A (Рис. 2).

Таким образом, мы показали и подтвердили двумя способами, что МЭФ нокаутные по Каизо, репрограммируются активнее. Возможно, белок Каизо может участвовать в молекулярных процессах связанных с репрограммированием.

S05-04**РОЛЬ БЕТА-2 ИНТЕГРИНА В АКТИВАЦИИ КАСКАДА WNT/В-КАТЕНИН****Мухаметшина Р.Т.¹, Баррето Г.²****¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, ²Институт исследований сердца и легких им. Макса-Планка**

Появляется все больше доказательств участия эпителиальных клеток легких в регуляции определенных воспалительных реакций путем модуляции сигнального каскада Wnt (Li, 2014). Так, было установлено, что мутации Wnt сигнальных компонентов являются причиной заболеваний человека. Ослабление Wnt/ β -катенин сигнализации приводит к синдрому остеопороза в связи с сокращением костной массы (Gong, 2001), в то время как усиление Wnt/ β -катенин сигнализации вызывает синдром утолщения костей, за счет увеличения костной массы (Little, 2002; Boyden, 2002). Таким образом, исследования Wnt каскадов имеют важное значение для биомедицины.

Ранее, проведенные нами исследования на мышах дикого типа и трансгенных мышах с нокаутом гена бета-2 интегрин (*Itgb2*^{-/-}) показали, что в легких трансгенных животных морфологических патологий не наблюдается. Кроме того было обнаружено, что у нокаутных мышей наблюдается достоверное снижение потребления кислорода по сравнению с мышами дикого типа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что одной из функций *Itgb2*^{-/-} является его участие в процессе газообмена клеток легких мышей (Мухаметшина Р.Т., 2013). В последующих исследованиях было также показано, что в нокаутах мышах *Itgb2*^{-/-} происходит активация β -катенина, который участвует как в регуляции процессах межклеточной адгезии, так и является фактором транскрипции. В дальнейших работах будет исследован процесс активации Wnt каскада в мышах с нокаутированным геном *Itgb2*.

S05-05**ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА (BDNF) НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРВИЧНЫХ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КУЛЬТУР ГИППОКАМПА ПОСЛЕ ГИБЕЛИ ЧАСТИ НЕЙРОНОВ**

Сахарнова Татьяна Александровна¹, Ведунова Мария Валерьевна², Митрошина Елена Владимировна¹, Шишкина Татьяна Викторовна², Мухина Ирина Васильевна¹

¹ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава Российской Федерации, ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Одним из актуальных вопросов современной нейробиологии и медицины является проблема восстановления функциональной активности нейронных сетей после тяжелых ишемических и травматических поражений головного мозга. Нарушение жизнеспособности отдельных нейронов ведет к деградации структурно-функциональной организации всей нейронной сети. Основными патогенетическими факторами развития нейродеградации при ишемии, травме и ряде других патологий является гипоксия и глюкозная депривация. Ранее нами было показано, что превентивное введение нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) способствует сохранению функциональной активности нейронных сетей и предотвращает гибель клеток в первичной диссоциированной культуре гиппокампа после воздействия стресс-факторов (Ведунова с соавт., 2011, Ведунова с соавт., 2012). BDNF участвует не только в дифференцировке нейронов и образовании синаптических контактов при нейрогенезе, но и является активным корректором метаболизма зрелых нейронов. Однако вопрос о возможности нейротрофического фактора участвовать в восстановлении функциональной структуры нейронных сетей после гибели части нейронов остается открытым. В связи с этим, целью наших исследований стало изучение влияния нейротрофического фактора BDNF на восстановление показателей спонтанной биоэлектрической активности после воздействия нормобарической гипоксии и глюкозной депривации.

Материалом исследования служили первичные диссоциированные культуры гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии CBA. Моделирование острой нормобарической гипоксии осуществлялось на 14 день развития путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Моделирование глюкозной депривации проводили путем замены культуральной среды на среду, не содержащую глюкозу, пируват, лактат. Исследование функциональной активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа осуществлялось с использованием мультитектродной системы MEA60 (MultichannelSystems, Германия). Для восстановления нами выбран период 3 суток после моделирования стресс-факторов (рис. 1). BDNF (1нг/мл) добавлялся ежедневно в культуральную среду в одно и то же время. Для определения влияния выбранной дозы на экспрессию эндогенного белка определяли количество мРНК BDNF с помощью флуорисцентных РНК-зондов (SmartFlare, MerckMillipore). Использование РНК-зондов позволяет прижизненно исследовать активацию гена и появление в цитоплазме мРНК нейротрофического фактора головного мозга.

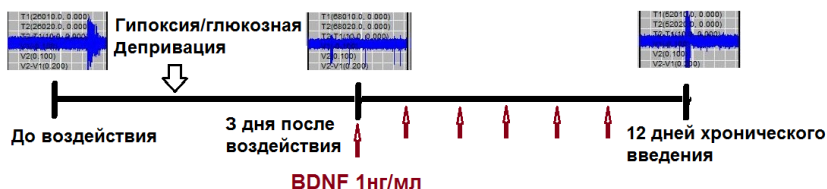


Рис. 1. Схема эксперимента по восстановлению спонтанной биоэлектрической активности после гибели части нейронов.

Исследования показали, что хроническое применение BDNF (1нг/мл) способствует восстановлению спонтанной биоэлектрической активности. Показано, что при глюкозной депривации преобладают некротические изменения, в то время как при гипоксии наблюдается появление апоптотически погибших клеток. Обнаружено, что через 12 дней хронического применения BDNF (1нг/мл) показатели спонтанной биоэлектрической активности достоверно выше, чем после воздействия стресс-факторов (рис. 2). Наблюдается восстановление структуры сетевой пачки. Показано достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества спайков в малой сетевой пачке и количества малых сетевых пачек (рис. 2).

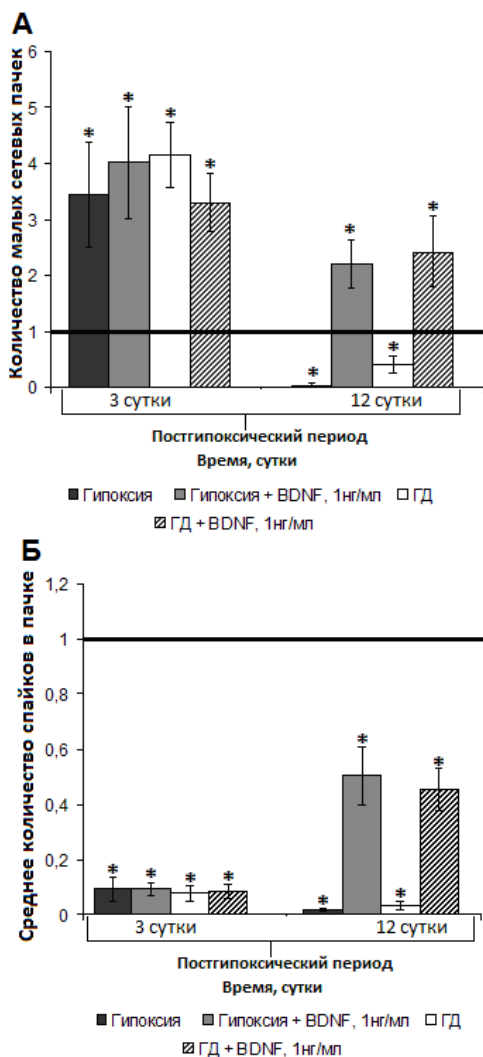


Рис. 2. Показатели спонтанной биоэлектрической активности первичных диссоциированных культур гиппокампа.

Следующим этапом наших исследований стала оценка влияния эффективной дозы BDNF (1нг/мл) на синтез эндогенного нейротрофина. Показано, что применение экзогенного BDNF в концентрации 1 нг/мл приводит к достоверному ($p<0,05$) снижению процента мРНК BDNF положительных клеток в первичной диссоциированной культуре гиппокампа через сутки после введения. Таким образом, применение BDNF в период после структурно-функциональной деструкции нейронных сетей, позволяет частично восстанавливать спонтанную биоэлектрическую активность. Однако выбранная нами эффективная доза BDNF не является оптимальной, так как подавляет синтез эндогенного мРНК BDNF.

Цитируемая литература:

1. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Коротченко С.А., Балашова А.Н., Мухина И.В. Влияние BDNF на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа в условиях глюкозной депривации // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Т. 2. № 2. 2011. С. 237-242.
2. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксические свойства нейротрофического фактора головного мозга при моделировании гипоксии в диссоциированных культурах гиппокампа // Современные технологии в медицине. 2012. №4, С. 17-23.

Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, грантом (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОН РФ и ННГУ) и, частично, базируется на работе, финансируемой Сколковским институтом науки и технологий (Сколтех) в рамках SkolTech/MITInitiative № 203 - MRA.

S05-06

ТЕХНОЛОГИЯ "КЛЕТОЧНЫХ НАКЛАДОК": ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Макаревич Павел Игоревич¹, Дергилев Константин Владимирович², Шевченко Евгений Константинович², Цоколаева Зоя Ивановна², Болдырева Мария Александровна², Глуханюк Евгений Владимирович¹, Парфенова Елена Викторовна²

¹Факультет Фундаментальной Медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, ²Лаборатория Ангиогенеза ИЭК РКНПК МЗ РФ

Многие исследования в области регенеративной медицины посвящены разработке новых, более эффективных методов стимуляции регенеративных процессов и ангиогенеза.

Одним из таких подходов может быть использование генетической модификации клеток, обладающих регенеративным потенциалом, с целью повышения последнего. Помимо общепринятых методов гипоксического прекондиционирования или обработки клеток ангиогенными факторами роста в настоящее время предлагается использование вирусных частиц, несущих гены ангиогенных белков, что позволяет добиться длительной экспрессии и, соответственно, более продолжительного эффекта.

Вторым не менее важным фактором является способ доставки клеток в ткани. Традиционная методика инъекции клеточной суспензии обладает разрушающим действием, особенно при большом кол-ве клеток. иДля того, чтобы обойти это препятствие, предлагается использовать минимальные тканеинженерные конструкции, носящие название «клеточных накладок» (*англ. cellsheets*). Последние представляют собой плотный слой клеток в комплексе с белками матрикса, который может быть пересажен в виде единой структуры методом прямой аппликации на поверхность ткани.

В наших исследованиях была изучена терапевтическая эффективность доставки мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, экспрессирующих VEGF165 человека, различными способами. На животных моделях ишемических заболеваний было показано, что модификация МСКЖТ повышает их терапевтический потенциал, что приводило к более выраженному восстановлению кровотока и увеличению плотности сосудов. Также нами был отработан способ пересадки клеток в виде «накладок», который показал свою высокую эффективность как на модели инфаркта миокарда, так и ишемии задней конечности, причем на последней было также отмечено улучшение восстановления кровотока по сравнению с введением суспензии.

Описанные методы могут быть использованы в регенеративной медицине, причем как для «пластики» зоны инфаркта миокарда, так и для покрытия язвенных дефектов или ожоговых поверхностей, а также открывают возможность для легкой, технологичной и не требующей носителей или скэффолдов генерации тканеинженерных конструкций, в том числе и из аутологичного материала.

S05-07

ГЕННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИМ ОБЛИТЕРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Мавликеев М.О.¹, Плотников М.В.², Гафиятуллина Г.Р.¹, Муртазин А.И.³, Ризванов А.А.¹, Салафутдинов И.И.¹, Газизов И.М.¹, Максимов А.В.², Гумерова А.А.¹, Киясов А.П.¹

¹Казанский (приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, ²Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия, ³Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Хроническим облитерирующим заболеваниям артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) уделяется незаслуженно малое внимание по сравнению с атеросклерозом коронарных артерий. Согласно эпидемиологическим данным, распространенность ХОЗАНК достигает 10% в популяции. Несмотря на прогресс в ангиохирургии, существует группа пациентов, для которых возможности хирургических и эндоваскулярных методов коррекции магистрального кровотока ограничены из-за невозможности адекватной реконструкции дистального сосудистого русла. В этих условиях все больший интерес представляют методы стимуляции неоангиогенеза с применением генной и клеточной терапии. Важным аспектом является понимание влияния проведенной терапии на патогистологию мышечной ткани пациентов с ХОЗАНК.

Цель исследования – изучение морфологических основ неоангиогенеза и мышечной регенерации после генной и клеточной терапии пациентов с ХОЗАНК.

Нами проведены ограниченные клинические исследования клеточной терапии ХОЗАНК (II степень ишемии по А.В. Покровскому) с применением аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (СК) периферической крови, а также прямой генной терапии ХОЗАНК (III-IV степени ишемии по А.В. Покровскому) с применением плазмид, обеспечивающих экспрессию VEGF и одновременную экспрессию VEGF и bFGF. Произведен отбор биоптатов икроножной мышцы пациентов до и через 3 месяца после проведенной терапии. Парафиновые срезы биоптатов окрашивали гематоксилином-эозином, по Массону, иммуногистохимически с антителами к CD34, ядерному антигену пролиферирующих клеток, миогенину, каспазе 3 и Bcl-2.

Полученные результаты позволили установить, что трансплантация СК ведет к увеличению плотности капиллярной сети, значительный прирост которой вызывает пролиферацию миоцеллюлитов, гипертрофию мышечных волокон и предотвращает апоптоз мышечных клеток. Показано, что эффект генной терапии плазмидами, обеспечивающими экспрессию сосудистых ростовых факторов, зависит от исходного состояния мышечной ткани: при сохранном состоянии мышечной ткани генная терапия может стимулировать гипертрофию мышц без значительного ангиогенного эффекта, а также способствовать деградации соединительной ткани.

S05-08**ГЕННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ****И.Я. Бозо^{1,2,3}, Р.В. Деев¹, А.Ю. Дробышев², А.А. Исаев¹**¹*Институт Стволовых Клеток Человека, Москва*²*Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.**Евдокимова*³*Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России*

Для реконструкции костей скелета, зачастую, требуется применение остеопластических материалов. Однако в ряде случаев, когда требуется не столько оптимизации естественного репаративного процесса, сколько его индукция и поддержание на высоком уровне до полного гистотипического восстановления, большинство из внедренных в клиническую практику изделий оказываются недостаточно неэффективными. В этой связи актуальны разработки активированных («оптимизированных») остеопластических материалов, содержащих биологически активные компоненты: факторы роста, клетки или генных конструкции, кодирующих факторы роста. В наших исследованиях мы сосредоточили усилия на разработке тканеинженерных и ген-активированных остеопластических материалов.

Для создания тканеинженерного костного графта (ТИКГ) мы использовали культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и различные носители, главным образом, деминерализованный костный матрикс. Учитывая критическую значимость ангиогенеза в обеспечении репаративного остеогенеза в качестве биологически активного компонента ген-активированного костного графта (ГАКГ) мы избрали плазмидные ДНК с геном, кодирующим VEGF, – действующее вещество лекарственного препарата «Неоваскулген» (Институт Стволовых Клеток Человека), обладающего выраженной ангиогенной активностью.

Все разработанные материалы: как тканеинженерные, так и ген-активированные – были исследованы *in vitro* и *in vivo* (в ортотопических условиях) для оценки биосовместимости, ключевых характеристик и биологической активности.

В условиях *in vitro* была показана оптимальная адгезия культуры ММСК к поверхности носителя при создании ТИКГ, а также биосовместимость ГАКГ с культурой ММСК и реализация генными конструкциями, входящими в его состав, целевого механизма действия. В эксперименте *in vivo* (дефекты черепа и костей голени кроликов) была выявлена эффективность разработанных изделий в восполнении костных дефектов.

Таким образом, генные и клеточные технологии позволяют разработать эффективные изделия для реконструкции костной ткани.

S05-09**КЛЕТочНАЯ КАРДИОМИОПЛАСТИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА****Михайличенко В.Ю., Эстрин С.И.****ГУ "Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины",
Донецк, Украина**

В эксперименте на крысах Вистар был проведен сравнительный анализ применения эмбриональных, мезенхимальных и комитированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а также введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Было показано, что по эффективности наиболее перспективным является применение МСК. Второй этап экспериментального исследования был посвящен изучению наиболее эффективного способа доставки клеточного материала (внутривенный, интрамиокардиальный и в полость левого желудочка). По данным морфологических исследований продемонстрировано, что наилучшим способом доставки клеточного трансплантата является внутривенный путь введения. Доказано, что чем меньше времени прошло от момента моделирования, тем эффективней действие трансплантата на ремоделирование сердца. В экспериментах на крысах Вистар продемонстрировано, что мезенхимальные стволовые клетки обладают хоуминг-эффектом, позволяющего им при системном введении попасть в зону ишемии миокарда и участвовать в образовании новых сосудов, стимулируя неоангиогенез и уменьшая площадь рубца. Вновь образованных кардиомиоцитов с фенотипом пересаженных МСК мы не наблюдали. Процесс неоангиогенеза сопровождался повышением концентрации оксида азота, VEGF, снижения концентрации эндотелина-1. Таким образом, анализируя вышеперечисленные данные, мы видим, что применение трансплантации МСК приводит к нормализации электрофизиологической работы сердца при стресс-имитирующей нагрузке, что сопровождается приближением параметров к показателям работы сердца здорового животного.

S05-10**ANALYSIS OF INDIVIDUAL VARIATIONS OF PROTEIN TARGETS FOR DRUG SELECTION AND PERSONALIZED THERAPY****Dr. Peter K. Vlasov,*****Centre for Genomic Regulation (CRG) and Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain***

Majority of modern drugs are low-molecular compounds that are ligands of particular protein targets in human organism (these proteins play a critical role in disease processes - and binding of ligands change the protein functionality and provide the therapeutical effect). Meanwhile, the protein-ligand interactions are sensitive to point mutations in proteins – and variations in protein sequences, especially in the binding sites, can crucially changes the ligands affinities. Taking into account the variability of human genome and the high occurrence of individual variations in proteins, it is predictable (and regular) situation then the drugs targeted to the “canonical” protein forms cannot interact with the particular mutant variants. The situations described above means individual incapability of the particular drug therapies. However, the modern theoretical (computational) methods for analysis of protein-ligand interaction give us the ability to estimate the effect of particular mutations on protein structures and to predict the binding specificity of ligands and drugs. Moreover, analysing the individual variations it is possible to select the alternative drugs (ligands) for non-canonical proteins observed in particular patients. Such an approach has the good perspectives for applications in medical practice and naturally realize the paradigm of personalized medicine.

S05-11**АДГЕЗИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ СТЕКЛЕ**

Белините Маргарита Александровна, Перес Хусаенова Эльмира Линовна, Кашапов Рамиль Наилевич, Фаттахова Альфия Нурлимановна

Казанский Федеральный (Приволжский) Университет. Казань, Россия.

Разработка новых технологичных и недорогих субстратов для культивирования клеточных культур для целей медицины и биотехнологии является неотъемлемой частью развития биомедицинской науки.

Целью нашего исследования было создание 2D-матрицы, обладающей определенными свойствами. Культуру гепатоцитов получали из печени самцов мышей CD-1 с помощью стандартного метода. Для выделения, культивирования и анализа клеточных культур использовали среду DMEM, раствор Хенкса, трипсин, L-глутамин, пенициллин, стрептомицин, коллагеназу и трипановый голубой. Культивировали клетки на модифицированном стекле с разным временем обработки в 5% CO₂ при 37°C в течение 5 дней, после чего анализировали клеточные популяции на контрольных и модифицированных стеклах. Гепатоциты и фибробласты прикреплялись на модифицированном и контрольных стеклах. Количество гепатоцитов на опытных матрицах было в 2.8 ± 0.2 раза больше, чем на контрольном гладком стекле, а количество фибробластов в 1.5 ± 0.5 раза было больше, чем на контрольных гладких стеклах.

Проведенное исследование позволило сделать вывод об эффективности культивирования гепатоцитов и фибробластов на стекле, модифицированном ионно-лучевым методом.

S05-12

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ МОДУЛИРУЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Пазина Т.Ю.¹, Кэмпбэлл К.С.², Шамова О.В.³

¹ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия; ²Фокс Чейз Центр, Филадельфия, США, ³Фокс Чейз Центр, Филадельфия, США, ³ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия; Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Множественная миелома (ММ) – злокачественное лимфопролиферативное заболевание плазматических клеток, которое сопровождается различными видами патологии. Несмотря на применение новых иммуномодулирующих препаратов, данное заболевание практически не поддается лечению и имеет рецидивирующее течение болезни. Средняя продолжительность жизни составляет 7-8 лет.

Антимикробные пептиды (АМП) являются ключевыми компонентами системы врожденного иммунитета и их наличие обнаружено практически у всех форм жизни. В большинстве случаев их главная роль состоит в инактивации чужеродных организмов. Однако, АМП могут выполнять и другие биологические функции: инициировать апоптоз, ранозаживление и иммуномодуляцию. В настоящее время повышен интерес в создании и разработке АМП, обладающих противоопухолевым действием. Помимо противобактериального и противоопухолевого действия для пептидов были также показаны иммуномодулирующие эффекты – их действие в качестве хемокинов (или/ и активация их продукции), модуляция клеточного ответа дендритных клеток и клеток адаптивного иммунного ответа.

АМП – могут рассматриваться, как перспективные агенты для лечения ММ за счет совокупности иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств. Известно, что естественные киллерные (ЕК) клетки играют важную роль в противоопухолевой защите организма, однако при ряде заболеваний, в том числе ММ, их функциональная активность снижается. Стимуляция функциональной активности ЕК клеток может стать одним из путей коррекции опухолевых заболеваний. В задачи нашей работы входило изучение влияния АМП на функциональную активность ЕК клеток больных ММ.

Нами было изучено влияние кателецидина LL-37 и протегрина PG-1 на лимфоциты периферической крови больных ММ. Лимфоциты были инкубированы с пептидами в различных концентрациях. Через 24 часа была измерена экспрессия маркера ранней активации лимфоцитов CD69 при помощи проточной цитометрии и флюоресцентных антител. Было показано, что экспрессия CD69 на ЕК клетках была увеличена на 40% как в присутствии LL-37, так и PG-1 по сравнению с контрольными. Полученные данные свидетельствуют о возможности модуляции функциональной активности ЕК клеток антимикробными пептидами врожденного иммунитета.

S05-13**ВЛИЯНИЕ RAB 5 НА ЛОКАЛИЗАЦИЮ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА ХАНТАВИРУСОВ В РАННИХ ЭНДОСОМАХ IN VITRO**

Муйангова М, Гагарина Е.Е, Ризванов А. А., Хайбуллина С. Ф.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

Цель данного исследования: определение влияния Rab 5 в ранних эндосомах на внутриклеточную локализацию нуклеокапсидного белка хантавирусов *in vitro*.

Материалы и методы. Используя технологию Gateway клонирования, кДНК нуклеокапсидного белка была субклонирована из плазмиды pUC57-AND-S (Genescript) в экспрессионный лентивирусный вектор pLX и подтвержден секвенированием. Лентивирусы были получены в культуре клеток HEK293T с помощью протокола Tronolab. Трансфекция культуры клеток эпителиальной линии A549 плазмидами DsRed-Rab5 WT (Plasmid 13050-Addgene), кодирующими Rab 5 дикого типа, и DsRed-Rab 5 DN(Plasmid 13051-Addgene), кодирующими доминантно-негативную мутантную форму белка соответственно, была осуществлена с помощью протокола ThermoScientific после трансдукции лентивирусами. Иммунофлуоресцентный анализ проводили используя протокол Abcam. Для визуализации нуклеокапсидного белка хантавируса применяли поликлональные антитела кролика к вирусу Андес и вторичные флуоресцентно-меченные (AlexaFlour 488) антитела ослы к иммуноглобулинам кролика. Флуоресцентный анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа AxioObserver.Z1 (CarlZeiss).

Результаты и обсуждение. Уровень флуоресценции нуклеокапсидного белка хантавируса был значительно меньше в культуре клеток, трансфицированных плазмидой DsRed-Rab5 DN. Мутантная доминантно-негативная форма белка приводит к блокированию процессов эндоцитоза на стадии ранних эндосом. Таким образом, можно сделать вывод, что Rab 5, возможно, участвует в транспорте и локализации нуклеокапсидного белка хантавирусов в ранних эндосомах.

S05-14

ТРАНСЛОКАЦИЯ NF-KB В ЯДРО МСК В ПРИСУТСТВИИ МИТОГЕНОВ ЗАВИСИТ ОТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МСК СО СТИМУЛИРОВАННЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ

Айзенштадт А.А.¹, Багаева В.В.¹, Бобков Д.Е.², Смолянинов А.Б.³, Самойлович М.П.⁴, Климович В.Б.⁴

¹ООО "Покровский Банк стволовых клеток", Санкт-Петербург, Россия, ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, ³СЗГМУ им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, ⁴Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

Изучение взаимодействия мезенхимных стволовых клеток (МСК) и лимфоцитов показало, что МСК не проявляют свои иммуномодулирующие свойства постоянно, и для их активации необходимо лицензирование МСК («licensing») медиаторами, которые выделяются в месте воспаления компонентами иммунной системы. В определении направленности и силы иммуномодулирующего действия МСК существенную роль может играть активация Toll-подобных рецепторов и сигнальные пути, опосредованные транскрипционным фактором NF-kB. Понимание механизмов и сигнальных путей, участвующих в осуществлении иммуномодулирующего действия МСК, позволит повысить эффективность клинического использования МСК.

Нами была исследована локализация транскрипционного фактора NF-kB в МСК, полученных из костного мозга, жировой ткани и пупочного канатика человека, в присутствии митогенов (ЛПС и ФГА в концентрации 10 нг/мл и 50 нг/мл соответственно) и стимулированных ими аллогенных лейкоцитов. Локализацию NF-kB определяли методом иммунофлуоресценции с использованием антител против субъединицы p65 и вторых антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa-488. Структуры актинового цитоскелета выявляли окраской родамин-фаллоидином. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа ZeissAxioScope 1. В интактных МСК NF-kB находится в цитоплазме и не обнаруживается в ядре. При инкубации с ЛПС или ФГА транслокацию NF-kB в ядро наблюдали через 30 минут в более, чем 90% клеток популяции, при этом его ядерная локализация сохранялась и через 24ч. Перестройки актинового цитоскелета наблюдали только при воздействии ФГА, но не ЛПС.

При контактном сокультивировании МСК и лейкоцитов через 30 мин инкубации с ЛПС или ФГА NF-kB обнаруживали в ядре только в 20±8% популяции МСК. Процесс транслокации NF-kB в ядро во всех клетках завершался не менее чем через 60-90 мин. При исключении прямого межклеточного контакта между МСК и лейкоцитами ядерную локализацию NF-kB наблюдали только через 3ч (в 10±12% популяции), полностью процесс завершался в течение 24ч. Сокультивирование МСК с лейкоцитами в присутствии митогенов не вызывало изменения локализации NF-kB в МСК. Транслокация NF-kB в МСК происходила одинаково во всех проанализированных культурах МСК, вне зависимости от источника получения.

Таким образом, под воздействием ЛПС и ФГА в МСК происходит транслокация транскрипционного фактора NF-kB в ядро. В смешанной культуре МСК и аллогенных лейкоцитов транслокация NF-kB происходит на более поздних сроках, что, по-видимому, является следствием взаимодействия МСК и стимулированных митогеном иммунокомпетентных клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00497

S05-15**МОДУЛЯЦИЯ СЕКРЕТОМА СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫМИ АДЕНОВИРУСАМИ**

**Салафутдинов И.И., Соловьева В.В., Черенкова Е.Е., Мартынова Е.В., Хайбуллина С.Ф.,
Ризванов А.А**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Одной из возможных стратегий повышения терапевтического потенциала трансплантируемых клеток является их генетическая модификация с целью сверх продукции ими различных секретлируемых факторов, а также для пре-адаптивной дифференцировки. В данной работе стволовые клетки из жировой ткани (СКЖТ) человека были трансдуцированы аденовирусными векторами (AD-VEGF165 или AD-EGFP). Проведена оценка цитокинового профиля секретомы нативных и генетически модифицированных клеток с помощью мультиметрической технологии xMAPLuminex. СКЖТ имели фибробласто-подобную морфологию, экспрессировали поверхностные маркеры и обладали способностью к дифференцировке, характерные для мезенхимных стволовых клеток. Анализ профиля цитокинов и хемокинов (Human Cytokine 27-Plex Panel, BioRad: IL-1 beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, FGF-2, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IP-10, MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, PDGF-BB, RANTES, TNF-alpha, VEGF) в супернатантах от нативных и генетически модифицированных СКЖТ выявило значительную секрецию клетками цитокинов про-воспалительного характера (IL-8, IL-9, IL-12, IL-17, IFN-gamma) цитокинов имеющих как про-воспалительный, так и анти-воспалительный характер (IL-6), хемокинов (IP-10, MCP-1, RANTES), а также факторов роста (bFGF, GM-CSF, PDGF-bb и VEGF). Клетки, трансдуцированные AD-VEGF165, имели значительно больший уровень секреции IL-8, IL-9, IL-12, IL-17, IFN-gamma, IL-6, MCP-1, RANTES, bFGF, GM-CSF, PDGF-bb и VEGF по сравнению с трансдуцированными AD-EGFP и нативными клетками.

S05-16**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКАХ ИЗ ТРЕТЬИХ МОЛЯРОВ ЧЕЛОВЕКА, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ПЛАЗМИДОЙ PBUD-SOX2-ОСТ4**

Соловьева В.В.¹, Блатт Н.Л.¹, Кузнецова Н.В.¹, Гусева Д.С.², Исламов Р.Р.², Ялвач М.Э.³, Ризванов А.А.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, ²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия, ³Университет Едитепе, Стамбул, Турция

Известно, что для эффективного перепрограммирования клетки необходим высокий уровень экспрессии факторов транскрипции — C-MYC, KLF4, SOX2 и OCT4. Ранее было показано, что мезенхимные стволовые клетки из зачатков третьих моляров человека (МСК-ЗТМ), имеют значительный уровень экспрессии мРНК генов C-MYC и KLF4 в сравнении с эмбриональными стволовыми клетками человека. В настоящем исследовании для повышения плюрипотентного потенциала МСК-ЗТМ, нами был сконструирован экспрессионный плазмидный вектор pBud-Sox2-Ost4, одновременно экспрессирующий факторы транскрипции SOX2 и OCT4. ПЦР в режиме реального времени показала, что генетическая модификация МСК-ЗТМ полученной плазмидой приводит к увеличению уровня экспрессии не только факторов транскрипции SOX2 и OCT4 в исследуемых клетках, но и фактора транскрипции NANOG. Фактор транскрипции NANOG является ранним регулятором плюрипотентности и транскрипционно регулируется непосредственно SOX2 и OCT4. Это может свидетельствовать о запуске процессов перепрограммирования клеток, что потенциально может повысить их потенциал к дифференцировке в различных направлениях.

S05-17**INHIBITORY AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF NIGELLA SATIVA AND SALVIA OFFICINALIS ON HELA AND MCF-7 CANCER CELL LINES BY INDUCTION OF APOPTOSIS****El-Shafei S.M.A.¹, Abd El-Rahman A.A.², Bikkullin A.G.¹, Alimova F.K.¹****¹Kazan Federal University, Kazan, ²Minia University, El-Minia, Egypt**

In recent years, there has been several epidemiological studies established a link between phytochemicals and the range of biological activities that impart health benefits in human beings. Therefore, the aim of this study was to investigate the inhibitory and cytotoxic activities of *Nigella sativa* (NS) and *Salvia officinalis* (SO) plant oils on the viability, apoptotic activity and morphological changes in HeLa and MCF-7 cancer cell lines. Cells were exposed to different concentrations of NS and SO oils (0, 20, 40, 60, 80 and 100 mg/ml). After 24h of incubation the effect of plant oils on the viability and apoptotic activity of the cancer cells were assessed by using trypan blue and TMRE assays. Morphological changes were examined by phase contrast inverted microscopy. Furthermore, the half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of these oils were assessed after 72 h of incubation by MTT assay. The results of our study revealed that treatment of HeLa and MCF-7 cancer cells with NS and SO significantly reduce the cell viability, stimulate the process of apoptosis, alter the cellular morphology and have cytotoxic effects in a concentration dependent manner. A concentration of 100mg/ml NS, 80 and 100 mg/ml SO resulted in a sharp decline in the cell viability percent of HeLa and MCF-7 by 68, 50, 62.3 and 55.5 respectively which was recorded by trypan blue assay. The percent of apoptotic HeLa and MCF-7 cells were increased by 59.47, 62.84, 19.84 and 39.53% due to treatment with NS and SO respectively. Various changes in the morphology of treated HeLa and MCF-7 cells were observed as some cells were shrunken, spaces between cells were increased and intercellular contacts were decreased. Finally, the half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of NS and SO in HeLa and MCF-7 were recorded as 1.70, 1.49, 5.66 and 0.68mg/ml respectively by MTT assay. These results revealed that NS and SO have a substantial ability to reduce the proliferation of HeLa and MCF-7 cancer cells.

S05-18**ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА IN
VITRO**

**Рамазанов Булат Рашитович¹, Анохин Владимир Алексеевич¹, Мартынова Екатерина
Владимировна², Ризванов Альберт Анатольевич², Хайбуллина Светлана Францевна³**

¹КГМУ, Казань, Россия, ²КФУ, Казань, Россия, ³WPIReNo,NV, USA

Нами был получен штамм вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) дикого типа от больных, не принимающих антиретровирусную терапию. Титр вируса был определен с помощью иммуноферментных наборов и стандартных сывороток фирмы Вектор-Бест. Плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) были получены путем магнитной сепарации на системе MACSmagnetic separation из мононуклеаров периферической крови человека (PBMC). Нативные PBMC и выделенные pDC активировали добавлением фитогемагглютинаина на протяжении 24 часов при 37° С, 5% CO₂. После этого был добавлен вирус ВИЧ-1 и клетки инкубировали 5 дней при 37° С, 5% CO₂. Методом проточной цитометрии доказано, что 0,6 % PBMC заражены вирусом ВИЧ-1, в то время как 98,3 % pDC заражены вирусом ВИЧ-1. Методом вестерн блоттинга показано, что pDC, зараженные вирусом ВИЧ-1, подвергаются рецептор-зависимому сигнальному пути апоптоза, о чем свидетельствовало повышение уровня caspase -3 и PARP. Полученные данные могут открыть новые аспекты патогенеза ВИЧ-инфекции, что, в свою очередь, поможет разработать методы патогенетического лечения в будущем.

S05-19**ОСТРАЯ ГИПОКСИЯ СТИМУЛИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРИ ТКАНЕВОЙ
КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА****Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Рылова Ю.В., Погодина М.В., Буравкова Л.Б.****ФГБУН ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, Россия**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) активно вовлечены в целый ряд процессов, связанных с поддержанием целостности тканей и их восстановлением после повреждения. Молекулярные механизмы, включающиеся в МСК при ответе на изменение их микроокружения, в частности на острую гипоксию при повреждении тканей, и приводящие к активации этих клеток, до сих пор исследованы недостаточно.

Экспансию периваскулярных МСК из жировой ткани человека проводили при концентрации O₂, характерной для тканевых депо МСК *in vivo* (5%). Затем после короткого гипоксического стресса (\geq 1% O₂, 24-72 часа) определяли жизнеспособность (МТТ-тест, AnnexinV-FITC/PI тест), продукцию интерлейкинов (ИЛ) (Th1/Th2 11 Plex FlowCytomix и ИФА анализ), активность СОД и образование МДА. Экспрессию HIF1 α оценивали ОТ-ПЦР в реальном времени.

Гипоксическое воздействие не влияло на жизнеспособность МСК, однако вызвало изменение функциональной активности клеток. После 24 ч гипоксии было выявлено достоверное снижение транскрипции HIF1 α . В кондиционированной среде МСК было выявлено увеличение продукции ИЛ 6 и 8. Кроме того, было отмечено накопление МДА и достоверное увеличение активности СОД. Через 72 часа сохранялась увеличенная продукция ИЛ-6 и - 8, а также были детектированы ИЛ-2 и ИЛ-10.

Таким образом, короткое гипоксическое воздействие на МСК при тканевых значениях O₂ не приводило к запуску канонического ответа через активацию HIF1 α -сигнального пути, что указывает на способность МСК к быстрой адаптации к повреждающему воздействию. Тем не менее, гипоксический стресс вызвал увеличение продукции ИЛ-6 и -8 -плейотропных медиаторов, вовлеченных в целый ряд биологических процессов. Так, активность ИЛ-6 может определять пролиферацию клеток и развитие воспалительного ответа и ремоделирование костной ткани за счет непрямого эффекта на дифференцировку остеокластов, а ИЛ-8 – один из основных цитокинов, регулирующих адгезию и трансмиграцию нейтрофилов и др. Соответственно, резкое снижение O₂ при повреждении тканей может быть триггером, запускающим механизмы, обеспечивающие вовлечение МСК в репаративный ответ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ #14-15-00693

S05-20**MICROINJECTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES TO THE RAT SPINAL CORD IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF CONTUSION****Shaykhtudinov N.M., Arnst N.I., Melnikova A.A., Baltin M.E., Mavlikeev M.O., Gerasimova E.V., Yakovlev A.V., Kiyasov A.P., Baltina T.V., Paveliev M.N.¹*****Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Russia*****¹*Neuroscience Center, University of Helsinki, Finland***

Axonal regeneration and restoration of functional synaptic connections are very limited in the injured spinal cord. The resulting deficit of motor and sensory functions represents a severe medical problem. We are developing an approach for peptide delivery to the spinal cord injury site in order to test the ability of biologically active peptides to promote regeneration. The experimental model of controlled impact contusion is used on adult rats. Stereotactic injection of solution volumes in microliter range is performed via glass micropipette connected to electronic controller. A battery of behavioral tests including rotarod, vertical grid climbing and foot print is used to assess animal behaviour after injury and injection. Histology and immunofluorescence techniques are used for the analysis of the delivered substance distribution in the injured tissue.

S05-21

GENOMOS: A NEW SYSTEM FOR CONTROLLING GENOME-WIDE EXPRESSION

Carlos Coral-Gomez

Bioinformatics Consultant, Boston, USA

Many applications of genomics in personalized medicine and biotechnology require knowing gene expression values with high precision. In this work, we present “Genomos”, an innovative automation system for monitoring, analysis and prediction of whole genome expression values based on a novel representation of gene expression: a dynamic state that cannot be observed directly but can be “inferred” from uncertain and incomplete sequential transcriptome measurements. Hence, gene expression regulation is regarded as a dynamic process which is analytically described by a linear dynamical system. In a sparse domain, “Genomos” applies a sequential Bayesian estimation method to update the probabilities of expression states recursively, using information from newly replicated transcriptome measurements. Thus, as the number of sequential measurements increases, “Genomos” rapidly reduces the uncertainty of expression state estimations, reaching highly accurate estimates after small number of measurements.

S05-22

СОЗДАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ МОДЕЛИ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ НАНОАГРЕГАТОВ ФЛАВОНОИДОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БИОСОВМЕСТИМЫМ ПОЛИМЕРОМ

Вакараева М.М.¹, Заярский Д.А.¹, Нечаева О.В.²

¹Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Саратов, ²Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов

Поиск новых высокоэффективных ранозаживляющих препаратов является актуальной проблемой современной ветеринарной и медицинской практики. Одним из перспективных направлений для решения этого вопроса становится создание структур «ядро-оболочка» и использованием различных гидрофобных носителей.

Целью нашей работы явилось конструирование структур, содержащих в качестве «ядра» наноагрегаты флавоноидов (диаметр 40-60 нм), на поверхности которых проводили последовательную адсорбцию биосовместимого полимера - полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов (ПААГ). Ранее для ПААГ установлена антимикробная активность в отношении стандартных и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Оценку ранозаживляющего действия полученных структур проводили на модели экспериментальных полнослойных ран на белых беспородных мышах (самцах), массой 18-20 г., для которых рассчитывали ежесуточное уменьшение площади в % по общепринятой методике (Кузин, Костюченко, 1990; Guletal., 2008).

Животные были разделены на 3 группы: опытная группа, раны которой обрабатывали препаратом, содержащим структуры «ядро-оболочка», контрольная группа 1, раны которой не обрабатывали, и контрольная группа 2, раны которой обрабатывали суспензией наноагрегатов флавоноидов.

В опытной группе животных наблюдалось статистически достоверное уменьшение площади раневой поверхности, начиная со вторых суток эксперимента, а полное заживление ран происходит на 8 сутки без развития осложнений. У животных контрольной группы 1 полное заживление ран наступало на 14 сутки от начала эксперимента, однако уже на 3 сутки у двух мышей появились небольшие участки нагноения подкожно-жировой клетчатки. Полное заживление ран контрольной группы 2 происходило на 11 сутки с образованием нежного рубца.

Оценка морфологических изменений ран показала, что нанесение препаратов, содержащих как стабилизированные, так и нестабилизированные наноагрегаты флавоноидов, ускоряют заживление полнослойных ран кожи путем стимуляции репаративных процессов и усиливает барьерно-защитную функцию кожи.

Высокая эффективность сконструированных нами препаратов по сравнению с нестабилизированными наноагрегатами флавоноидами позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств для лечения неосложненных и гнойных ран.

S05-23**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА КРИОКОНСЕРВАЦИИ ТКАНИ ЯИЧНИКОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ****Абакушина Е.В.¹, Отой Т.²****¹ФГБУ Медицинский радиологический научный центр Минздрава России, г. Обнинск, Россия, ²Университет Ямагути, г. Ямагути, Япония**

В последние годы увеличилась выживаемость онкологических больных, однако успехи в лечении нередко приводят к бесплодию у молодых пациентов. В случаях, когда нет возможности избежать токсического действия на репродуктивные органы – криоконсервация ткани яичников до начала лечения может помочь сохранить фертильность таких пациентов. Хорошо известно, что яичник млекопитающих содержит огромный запас покоящихся яйцеклеток. Большое количество этих незрелых фолликулов создает потенциальный для оплодотворения источник зрелых яйцеклеток. Для того, чтобы использовать женские половые клетки из ткани яичников, очень важно сохранить эту ткань до того как ооциты начнут подвергаться дегенерации вследствие токсического лечения. Криоконсервация и трансплантация ткани яичников два новых метода сохранения фертильности, особенно у молодых онкологических больных. Если эти техники будут внедрены в клиническую практику, они должны быть безопасными, легко воспроизводимыми и результативными. Успехи современной криобиологии дали возможность сохранения ткани яичников с минимальной потерей жизнеспособности. Если токсические воздействия химиолучевой терапии не удастся избежать, врачи должны знать о способах сохранения фертильности и предлагать их пациентам. Возможность иметь генетически родственного ребенка очень важна для пациентов излеченных от рака.

S05-24

ИНТЕГРАЦИЯ ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ О ХРОМОСОМНЫХ КОНТАКТАХ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ПО МЕТОДУ ChIA-PET

Орлов Ю.Л.¹, Кулакова Е.В.², Спицина А.М.², Дергилев А.И.², Свичкарев А.В.², Афонников Д.А.¹, Чен М.³, Ли Г.⁴, Руан Й.⁴, Колчанов Н.А.¹

¹*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия,* ²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия,* ³*Университет Чжецзянь, Ханчжоу, Китай,* ⁴*Аграрный Университет Хуачжонг, Ухань, Китай*

Интеграция данных о регуляции экспрессии генов эукариот имеет большое фундаментальное и прикладное значение. Особое место среди методов, основанных на иммунопреципитации хроматина (ChIP) и последующем секвенировании, занимает метод ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End-Tag sequencing), который позволяет исследовать не только отдельные сайты связывания, но пары таких сайтов на районах хромосом, контактирующих в трехмерном пространстве ядра клетки (Lietal., 2012). В последние годы с использованием методов Hi-C, ChIA-PET и TCC получены новые знания об особенностях трехмерной архитектуры (укладки) генома человека в интерфазном ядре. С помощью собственных компьютерных программ была проанализирована информация о хромосомных контактах, опосредованных транскрипционным фактором - рецептором эстрогена ER, полученных с помощью метода ChIA-PET, для клеточных линий человека (Fullwood et al., 2009). Рассмотрены хромосомные контакты между регуляторными (промоторными) районами генов, образуемые комплексом РНК-полимеразы II, и представлена их иерархическая классификация. Показано, что геномные области хромосомных контактов, опосредованных комплексом РНК-полимеразы II, обогащены сайтами связывания транскрипционных факторов, полученных по данным проекта ENCODE, и участками модификаций гистонов, связанными с активацией экспрессии генов.

LiG. et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. Cell. 2012. 148(1-2):84-98.
 Fullwood M.J. et al. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. Nature. 2009. 462(7269):58-64.

S05-25

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И РАЗМНОЖЕНИЕ ПОСТМИТОТИЧЕСКИХ, ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗРЕЛЫХ КЛЕТОК СЕРТОЛИ**С.М.Павлюченкова¹, Т.Л.Маршак², С.Т.Захидов¹****¹Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия, ²Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, Москва, Россия**

Развитие мужских половых клеток идет при активном участии соматических клеток Сертоли (КС). В норме у половозрелых млекопитающих КС терминально дифференцированы и не циклируют. Поэтому долгое время КС, наряду с нейронами и кардиомиоцитами, относили к стабильным клеточным популяциям. Однако наши первые цитогенетические, количественные и радиоавтографические исследования показали, что в семенниках мутагенизированных грызунов при высоком уровне деструкции сперматогенной системы, огромных клеточных потерях высокодифференцированные КС способны переходить из состояния квазипокоя к активной пролиферации и ядерным делениям. В настоящей работе с использованием двойного комбинированного окрашивания маркерами КС виментином или Wt1 (Wilmstumor 1) и маркером клеточной пролиферации бромдезоксисуридином подтверждена способность КС, полученных из гонад половозрелых мышей линии C57Bl/6, пролиферировать в условиях культивирования. Более того, среди культивируемых КС с типичной для них в условиях *in vivo* организацией ядра весьма часто встречались двуядерные клетки, клетки с ядерными протрузиями и микроядрами, и, как показали цитофотометрические измерения, клетки, в ядрах которых содержание ДНК-фуксина варьировало от 2С до 4С, также были обнаружены тетра- и октаплоидные ядра КС. Надо сказать, что измерения содержания ДНК-фуксина в КС позволили получить не только количественную характеристику, но выявить качественные изменения, происходящие в хроматине клеток, развивающихся в неоптимальных условиях. Такие изменения, в частности, могут служить дополнительным доказательством перехода клеток к пролиферации. Итак, полученные нами данные и сведения, имеющиеся в литературе, подтверждают положение о том, что необратимое блокирование размножения случаем редкий, скорее всего характерный только для деления нейронов, который угрожает нарушением и разрушением нервной системы (Рапопорт, 1993). Для сперматогенеза деления КС, очевидно, не только не фатальны, а, напротив, в гонадах с деструктивной организацией сперматогенного эпителия митозы КС служат базой для обновления и нормализации пула этих клеток и, как следствие, последующего восстановления нормального развития мужских половых клеток.

S05-26

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ VEGF165 И NCAM1В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO И ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТРАНСГЕННЫМ МЫШАМ С МОДЕЛЬЮ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Черенкова Екатерина Евгеньевна¹, Мухамедшина Яна Олеговна¹, Федотова Валерия Юрьевна¹, Сафиуллов Зуфар Зуфарович², Исламов Рустем Робертович², Ризванов Альберт Анатольевич¹

¹ФГАОУ ВПО "Казанский федеральный университет", ²ГБОУ ВПО Казанский Государственный медицинский университет

Боковой амиотрофический склероз — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением центральных и периферических мотонейронов. Одной из причин наследственной формы БАС является мутация в гене Cu/Zn – супероксиддисмутазы (*sod1*), где триплет глицина замещен на аланин в положении 93. В предыдущих исследованиях нами было показано, что мононуклеарные клетки пуповинной крови человека (МКПК), трансфицированные плазмидной конструкции pBud-VEGF165-L1NCAM мигрируют в очаг нейродегенерации и синтезируют рекомбинантные белки.

Ранее с использованием технологии клонирования Gateway были получены рекомбинантные аденовирусы Ad5-VEGF165 и Ad5-NCAM1. Генетическую модификацию мононуклеарных клеток пуповинной крови проводили рекомбинантными аденовирусами при MOI 10. Через 16 часов модифицированные клетки вводили трансгенным мышам B6SJL-Tg (SOD1-G93A) dl1Gur/J с фенотипом БАС. Параллельно осуществляли культивирование модифицированных и нетрансдуцированных МКПК. Через 120 часов после трансдукции проводили оценку эффективности экспрессии генов *vegfl65* и *ncam1*. Генетическая модификация МКПК привела к значительному увеличению уровня мРНК генов *vegfl65* и *ncam1*. Экспрессия рекомбинантных белков VEGF165 и NCAM₁ подтверждена методом ПЦР и иммуоблоттинга.

Иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антител к ядерному антигену человека показало миграцию МКПК в очаг поражения. Кроме того, трансплантированные клетки окрашивались положительно поликлональными антителами кролика к VEGF и моноклональными антителами мыши к NCAM1. Таким образом, доказана эффективность доставки рекомбинантных VEGF165 и NCAM₁ с помощью МКПК для терапии БАС.

S05-27**СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА, ОДНОВРЕМЕННО КОДИРУЮЩЕГО КОДОН-ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФАКТОРА РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ И ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ****Черенкова Екатерина Евгеньевна, Шарипова Эльвира Ильдаровна, Ризванов Альберт Анатольевич, Киясов Андрей Павлович*****ФГАОУ ВПО "Казанский федеральный университет"***

Генная терапия—перспективный подход для лечения ряда заболеваний человека, в частности, фиброза печени. Фактор роста гепатоцитов HGF - это сильный митоген для гепатоцитов, участвующий в регенерации печени, стимулирующий пролиферацию некоторых типов эпителиоцитов, а также клеток сосудистого эндотелия и меланоцитов. Фактор роста фибробластов стимулирует деление различных клеток мезенхимного происхождения, включая гладкомышечные и клетки сосудистого эндотелия. Преимущества аденовирусных векторов очевидны: эффективный перенос генов как в делящиеся, так и в покоящиеся клетки, не встраиваются в геном, обеспечивают высокие титры рекомбинантного вируса и высокий уровень экспрессии транскриптов. Одним из методов усиления экспрессии рекомбинантных генов и биосинтеза терапевтических белков является кодонная оптимизация кодирующей последовательности, основанная на вырожденности генетического кода. Для обеспечения одновременной экспрессии генов применяются «саморасщепляемые» 2А-пептидные аминокислотные последовательности вируса ящура, позволяющие значительно сэкономить генетическую информацию, при этом обеспечивая эквимоллярный уровень белков. Целью исследования - создание и очистка рекомбинантных аденовирусов, содержащих кодон-оптимизированные последовательности кДНК фактора роста гепатоцитов и фактора роста фибробластов 4. Клонирование осуществляли по технологии Gateway, базирующейся на сайт – специфической рекомбинации между сайтами att плазмиды-донора (pUC-coHGF-P2A-coFGF4-T2A-RFP) и вектора-назначения (pAd/CMV/V5-Dest). Трансфекция клеточной линии HEK293A рекомбинантной плазмидой pAd-coHGF-P2A-coFGF4-T2A-RFP привела к эффективной экспрессии рекомбинантных генов, что подтверждено иммунофлуоресцентным анализом с применением специфичных антител, и получению высокого титра вирусных частиц. Таким образом, получен рекомбинантный аденовирус, ко-экспрессирующий гепатопротекторные факторы HGF и FGF4. В дальнейшем полученный вирус будет применяться в экспериментах *in vivo* и *in vitro* для разработки методов генной терапии фиброза печени.

S05-28

АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДА N-АРАХИДОНОИЛДОФАМИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Митрошина Елена Владимировна¹, Ведунова Мария Валерьевна², Сахарнова Татьяна Александровна¹, Бобров Михаил Юрьевич³, Хаспеков Леонид Георгиевич⁴, Мухина Ирина Васильевна²

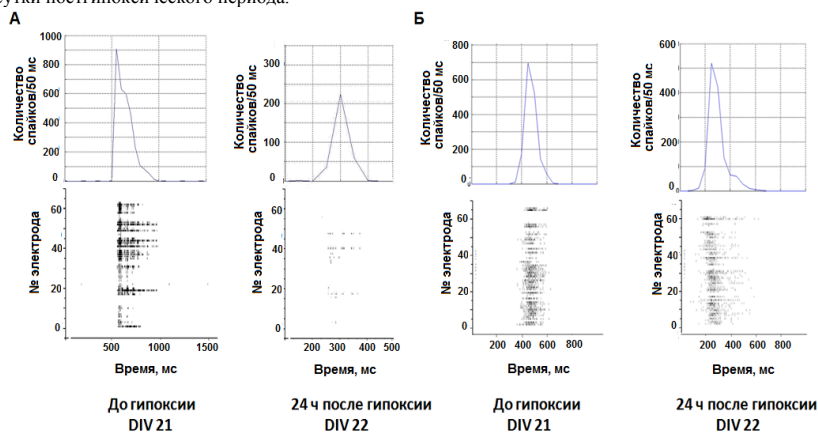
¹Нижегородская медицинская академия, г. Нижний Новгород, Россия, ²Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, ³Институт Биорганической химии им.М.М. Овчинникова и Ю.А. Шемякина РАН, Москва, Россия, ⁴Гу Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия

Поиск способов, позволяющих предотвратить потерю функциональной активности нейронных сетей головного мозга при воздействии ишемии - одна из наиболее актуальных задач нейробиологии и медицины на сегодняшний день. Выявление новых молекулярных мишеней управления адаптационными возможностями организма позволяет не только изучить фундаментальные основы жизнедеятельности организма, но и разработать новые пути коррекции и предупреждения нарушений функций нервной системы, возникающих при воздействии стрессогенных факторов. Механизм регуляции синаптической передачи в возбуждающих и тормозных синапсах различными агонистами каннабиноидных рецепторов путем ретроградного ингибирования выброса нейротрансмиттеров, т.е. через активацию обратной отрицательной связи для поддержания гомеостаза нейронной сети, предполагает, что эндогенной каннабиноидная система является одной из стресс-лимитирующих системы мозга. Эндогенная каннабиноидная система (ЭКС) участвует в поддержании нормального функционирования нейронных сетей головного мозга в условиях ответной реакции клеток на ишемическое повреждение, одним из ведущих факторов которого является гипоксия. Кислородная депривация приводит к нарушениям окислительного фосфорилирования в митохондриях, изменению синаптической передачи, гибели нервных клеток и разрушению нейронных сетей. Эндоканнабиноиды принадлежат к одному из активно изучаемых в последнее время семейств нейроактивных регуляторных липидов. В настоящее время активно изучаются нейропротекторные свойства различных агонистов каннабиноидных рецепторов. ЭКС играет важную роль в поддержании нормального функционального состояния синапсов и может способствовать сохранению их функции и восстановлению при патологии ЦНС, связанной с нарушением регуляции нейромедиаторных процессов, в том числе и при гипоксическом повреждении. Недавно было показано, что активация каннабиноидных рецепторов 1 типа вызывает усиление синтеза нейротрофических факторов, в том числе нейротрофического фактора головного мозга BDNF, который также обладает нейропротекторными свойствами. N-арахидоноилдофамин (N-ADA) - недавно описанный и синтезированный эндоканнабиноид. Ранее было показано, что он обладает антиоксидантными свойствами и оказывает цитопротекторное действие на нейроны в культурах мозжечка крысы при моделировании окислительного стресса, апоптоза и глутаматной токсичности. В связи с этим, целью данной работы стало изучение нейропротекторных и антигипоксических эффектов N-ADA, а также выявление возможных молекулярных механизмов его защитного действия.

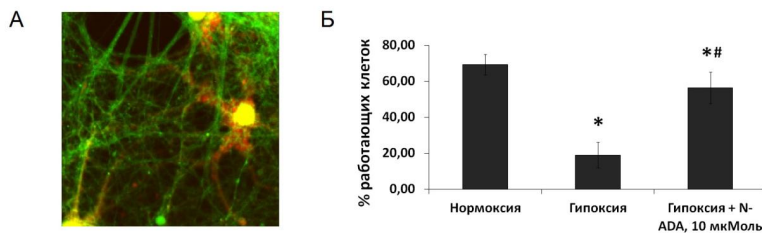
Объектом исследования явились первичные эмбриональные (E18) диссоциированные культуры гиппокампа мыши (линия CBA). Моделирование острой нормобарической гипоксии осуществлялось на 14 день развития культур путем 10 минутной замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Исследование функциональной активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа осуществлялось с использованием мультieleктродной системы MEA60 (MultichannelSystems) и функционального кальциевого имиджинга с использованием Ca²⁺-чувствительного красителя OregonGreen (Invitrogen) в течение 7 дней после моделирования

гипоксии. Для оценки изменения экспрессии мРНК BDNF при активации эндоканнабиноидной системы применялись РНК-зонды (SmartFlare, MerckMillipore). Использование РНК-зондов дает возможность прижизненно исследовать активацию интересующего гена и появление в цитоплазме мРНК. Жизнеспособность клеток в культуре исследовалась в течение 10 дней после моделирования гипоксии, с использованием пропидиум иодида (Sigma) для подсчета мертвых клеток и бис-бензидимида (Sigma) для определения общего количества клеток.

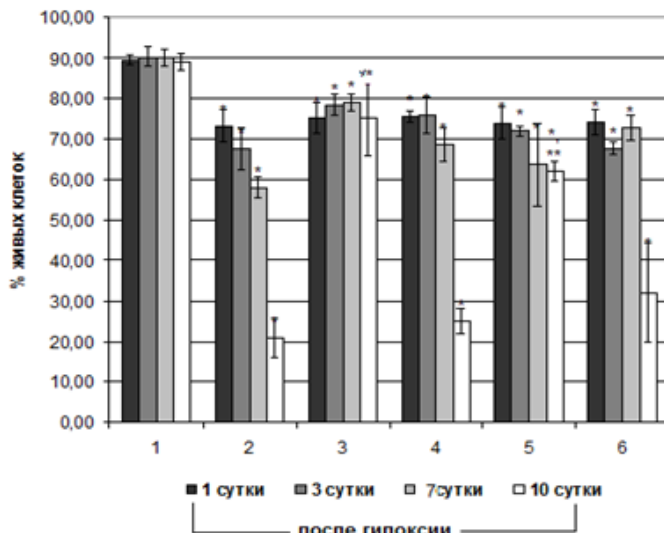
Исследование показало, что N-арахидоноилдофамин предотвращает гибель клеток и нарушение их функциональной активности при остром гипоксическом повреждении, то есть обладает выраженными антигипоксическими и нейропротективными свойствами. Показано поддержание спонтанной биоэлектрической активности нейронной сети, а также сохранение структуры пачек импульсов (рис. 1) при аппликации N-ADA 10 мкМ во время моделирования гипоксии и в первые сутки постгипоксического периода.



N-ADA оказывает антигипоксическое действие на индуцированные гипоксией изменения спонтанной кальцевой активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа, что проявляется в сохранении числа клеток, проявляющих спонтанную кальцевую активность (рис. 2), а также частичной нормализации частоты и длительности кальцевых осцилляций.



Показано, что аппликация N-ADA (10 мкМ) во время моделирования острой нормобарической гипоксии и в течение первых суток после нее предотвращает гибель клеток диссоциированных культур гиппокампа в постгипоксическом периоде (рис.3).



Было показано, что ключевую роль в реализации антигипоксического и нейропротекторного эффектов N-ADA играет активация каннабиноидных рецепторов 1 типа (CB1) и ванилоидных рецепторов TRPV1, их фармакологическая блокада достоверно снижала выживаемость клеток в постгипоксическом периоде. Применение антагонистов каннабиноидных рецепторов 2 типа в меньшей степени нивелировало нейропротекторный эффект N-ADA.

В последние годы появились сведения, что активация каннабиноидных рецепторов, кроме ретроградного ингибирования выброса возбуждающих нейромедиаторов, вызывает усиление синтеза нейротрофинов, которые также обладают нейропротекторными свойствами. Проведенные исследования показали, что добавление N-ADA вызывает усиление экспрессии мРНК BDNF клетками культур гиппокампа, которое не наблюдается в контрольных группах культур.

Таким образом, наше исследование демонстрирует антигипоксический и нейропротекторный эффект N-ADA при острой нормобарической гипоксии, а также существенный вклад активации CB1 и TRPV1 рецепторов в реализацию данных эффектов.

Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, грантом МОН (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОН РФ и ННГУ), частично базируется на работе, финансируемой Сколковским институтом науки и технологий (Сколтех) в рамках SkolTech/MITInitiative № 203 – MRA

S05-29**ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SH-SY5Y НА АНГИОГЕНЕЗ****М.О. Гомзикова, М.Н. Катина, А. Яковлева, К. Яковлева, А.А. Ризванов****ФГАОУВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия**

При ишемическом повреждении ткани известно успешное применение клеточной терапии. Основной положительный эффект на процесс ангиогенеза связывают со способностью трансплантированных клеток к воздействию на клетки микроокружения посредством межклеточной коммуникации. Известно, что активно пролиферирующие опухолевые клетки стимулируют активацию, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Несмотря на риск, связанный с применением опухолевых клеток, известны клинически апробированные вакцины на основе митотически инактивированных опухолевых клеток. Помимо митотической инактивации, еще одним способом минимизировать онкологические риски является получение субклеточных препаратов, не содержащих целых жизнеспособных клеток. В этой связи целью нашей работы явилось исследование влияния искусственных микровезикул (иМВ) и инактивированных клеток нейробластомы человека SH-SY5Y на ангиогенез *in vitro* и *in vivo*.

Клетки SH-SY5Y, митотически инактивированные клетки SH-SY5Y и иМВ, выделенные от клеток SH-SY5Y, стимулируют формирование капиллярно-подобных структур HUVEC *in vitro*, а также прорастание сосудов в матрикс, введенный подкожно крысам *Rattus norvegicus in vivo*. При этом проангиогенное действие иМВ *in vitro* оказалось сравнимо с эффектом, индуцированным клетками SH-SY5Y (43,5±3,53 разветвления капиллярно-подобной сети против 41,33±8,51).

Из полученных данных можно сделать вывод, что митотически инактивированные клетки SH-SY5Y и иМВ, выделенные от клеток SH-SY5Y, сохраняют способность и могут служить безопасным инструментом стимуляции ангиогенеза.

S05-30**ЭКСПРЕССИЯ PCNA В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ****М.С. Калигин, А.А.Титова, А.С.Плюшкина, М.А.Титова, А.А.Гумерова, А.П.Киясов*****Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия***

Важнейшим событием репаративной регенерации является усиление пролиферативной активности (ПА) клеток в поврежденном органе. Однако ПА клеток поджелудочной железы (ПЖ) при экспериментальном диабете изучена очень мало. Целью нашего исследования стало изучение ПА в ткани ПЖ при экспериментальном аллоксановом диабете (ЭАД). Исследование проведено на 33 белых беспородных крысах самцах. 1-й группе внутривенно вводили аллоксан (Sigma-Aldrich) в 1 мл 0,02 М ацетатного буфера pH = 4,0 в дозе 180 мг/кг, 2-й группе - ацетатный буфер. 3-й группе ничего не вводили (норма). Через 1, 2, 3, 5, 7 суток у животных забирали кровь для биохимического исследования, выводили из эксперимента и забирали ПЖ. Парафиновые срезы ПЖ окрашивали антителами против ядерного антигена пролиферирующих клеток (ProliferatingCellNuclearAntigen (PCNA), DAKO), инсулина (Novocastra, UK). Мы обнаружили экспрессию PCNA в норме и при ЭАД в клетках островков и ацинусов ПЖ. Количество PCNA+ клеток существенно возрастало уже через сутки ЭАД, на этом сроке ПА была максимальной и далее она оставалась повышенной на всех исследованных сроках. В ходе двойного окрашивания в островках через 2-е суток обнаружены PCNA+ клетки, синтезирующие инсулин. Таким образом, в островках ПЖ имеются клетки-предшественники способные к делению и дифференцировке в инсулин-продуцирующие клетки.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

S05-31**E. COLI STRAINS FOR RECOMBINANT UBI18-35 AND pHLIP PEPTIDES PRODUCTION****D. Burlakova¹, A. Pershina^{1,2}, A. Sazonov²**¹*National Research Tomsk Polytechnic University,*²*Siberian State Medical University.*

Currently, peptides are widely used in diagnostic. These molecules have smaller sizes in comparison with the proteins but can provide the high-specific binding with target cells. Peptides are nearly invisible to the immune system and are expected to cause minimal or no side effects (Shadidi M., 2003). Compared with isolation from natural sources and chemical synthesis, recombinant approach offers the most cost-effective technology for large-scale peptide production. The aim of this work was to obtain two E.coli strains, transformed by recombinant vectors encoding UBI18-35 and pHLIP peptides.

The radionuclide labeled peptide UBI18-35 application field is becoming a differential diagnostic of sterile and microbial-associated inflammations. The pHLIP (pH Low Insertion *Peptide*) is successfully used for targeting to a number of pathological states associated with extracellular acidosis, such as cancer, ischemic stroke, infection, arthritis (D.Engelman, 2009).

The pET-31b+ vector (Novagen) and E.coli XL-blue strain were chosen for the cloning of peptides. Two pairs of oligonucleotides, encoding target peptides with overlapping region of 20 b.p. were synthesized ("Biosynthesis", Novosibirsk) and amplified using PCR method. The cloning procedure was provided according to standard protocols (Maniatis, 1988), restriction, dephosphorilation were realized according to manufacturer's instruction (SibEnzyme), plasmids isolation and purification were performed using Plasmid Miniprep and Clenup standard kits (Evrogen). To confirm the successful integration of peptide encoding fragment into the vector, the sequencing analysis using T7 promoter and T7 terminator primers was provide in The Research Institute of Medical Genetics SB RAMS (Tomsk).

In case of UBI18-35 peptide the successful cloning was only achieved with the use of doubled sequence insertion. The received recombinant plasmid, which encoding pHLIP peptide, included single copy of encoding sequence. E.coli Rossetta DE3 pLysS strain was transformed by received recombinant plasmids for the expression of two target recombinant *peptides as ketosteroid isomerase (KSI) fusion proteins.*

S05-32**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА****М.О. Гомзикова, С.К. Расулова, А.А. Ризванов****ФГАОУВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия**

Использование естественных образований клеток человека –микровезикул (МВ) -в качестве средства доставки терапевтических препаратов является новым перспективным направлением биомедицины, поскольку МВ лишены иммуногенности и при этом, благодаря наличию рецепторов на своей поверхности, обладают определенной адресностью доставки. Однако количество выделяемых клеткой естественных микровезикул ограничено и не достаточно для их терапевтического применения. В этой связи целью нашей работы явилось получение и характеристика искусственных микровезикул (иМВ) клеток человека из генетически модифицированной культуры клеток НЕК 293 FT. В качестве маркера, позволяющего проследить путь микровезикул от образования клеткой-продуцентом до слияния с клеткой-реципиентом использовали зеленый флуоресцентный белок GFP, ген которого встроен в плазмиду pEGFP-N2.

Методами флуоресцентной микроскопии и ПЦР с использованием праймеров, специфичных к последовательностям генов 18S рРНК, EGFP иCOI, нами обнаружено, что в образце иМВ отсутствуют жизнеспособные клетки, способные к пролиферации, а иМВ включают в себя цитоплазматическое содержимое клетки, в том числе органеллы (митохондрии) и плазмидную ДНК. Кроме того показано, что при нанесении искусственных микровезикул на клетки (MCF7 и НЕК 293 FT) происходит их слияние и перенос содержимого в клетку-реципиента. Таким образом, иМВ, отвечая сразу двум важнейшим критериям – безопасностью и эффективностью, могут выступать в качестве новой векторной системы для генной терапии.

S05-33**ВЫДЕЛЕНИЕ И ФЕНОТИПИРОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ
ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА****Тазетдинова Л.Г.¹, Соловьева В.В.¹, Масгутов Р.Ф.², Ризванов А.А.¹****¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, ²Республиканская
клиническая больница, Казань, Россия**

Жировая ткань является источником стволовых клеток, которые на сегодняшний день активно исследуются для применения в регенеративной медицине и других биомедицинских приложениях. Стволовые клетки из жировой ткани человека (СКЖТ) секретируют трофические и протекторные факторы, а также обладают мультипотентным потенциалом дифференцировки. СКЖТ обладают фенотипом мезенхимных стволовых клеток и способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях.

В нашей работе образцы подкожной жировой клетчатки были получены в ходе плановой косметологической операции (липосакции). СКЖТ были выделены с помощью ферментативной обработки 0,2% раствором коллагеназы краба (Биолот). Выделенные клетки имели фибробластоподобную морфологию и обладали способностью к длительной пролиферации *in vitro* (более 8 пассажей).

Иммунофенотипирование выделенных СКЖТ проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания специфичными антителами к маркерам дифференцировки (CD14, CD29, CD45, CD73, CD90, CD105, CD133 и CD166) и дальнейшего анализа на проточном цитометре GuavaeasyCyte 8HT (Millipore). Было показано, что большинство СКЖТ экспрессируют поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток человека: CD29, CD73, CD90, CD105 и CD166. В то же время СКЖТ не экспрессировали маркеры дифференцировки CD14, CD45 и CD133, характерные для гемопоэтических клеток.

S05-34

ПРЯМАЯ И КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ УВЕЛИЧИВАЕТ КОЛИЧЕСТВО ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК-МИГРАНТОВ В ОБЛАСТИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫС**Мухамедшина Я.О.¹, Повышева Т.В.², Чельшев Ю.А.², Ризванов А.А.¹****¹ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ²ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»**

Шванновские клетки (ШК) способны проникать в область травмы спинного мозга, участвовать в ремиелинизации аксонов ЦНС и восстанавливать в них проводимость. Подобное поведение ШК представляется исключительно позитивным для замещения миелинообразующей функции поврежденных или погибших олигодендроцитов. Наши исследования показывают, что прямая (плазмидные и аденовирусные вектора) и клеточно-опосредованная (моноклеарные клетки крови пуповины человека - МККП) доставка генов нейротрофических и ангиогенных факторов способствует увеличению количества как миелинообразующих, так незрелых ШК в области травматического повреждения спинного мозга крыс. Большой эффект по данному критерию наблюдается в группах с доставкой генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF2) при помощи МККП человека. Установленный рост численности популяции ШК может быть результатом поддержания их выживания, повышения их способности к миграции в область повреждения, либо увеличения пролиферативной активности. Следующим этапом исследований станет проверка всех трех указанных гипотез.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-31246_мол_а.

S05-35**СОЗДАНИЕ И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИОННОГО ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА, КОДИРУЮЩЕГО КДНК ГЕНА ДИСФЕРЛИНА ЧЕЛОВЕКА**

Старостина И.Г., Соловьева В.В., Ризванов А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Дисферлинопатии — гетерогенная группа аутосомно-рецессивных заболеваний мышц человека, которые являются результатом дефектов или недостатков белка дисферлина. Мутации в гене дисферлина *Dysf* вызывают конечностно-поясную мышечную дистрофию типа 2В. В нашей работе было проведено клонирование гена *Dysf* в вектор pCMV-SPORT6 с помощью сайт-специфичной рекомбинации по технологии Gateway. Правильность сборки генетической конструкции и отсутствие мутаций в последовательности гена дисферлина были подтверждены с помощью секвенирования. Для оценки функциональности полученной экспрессионной плазмиды проводили генетическую модификацию клеток HEK293. Для оценки экспрессии белка DYSF в трансфицированных клетках HEK293 проводили иммунофлуоресцентный и вестерн-блотт анализы. Иммунофлуоресцентный анализ клеток HEK293Т, трансфицированных плазмидой pCMV-Dysf, выявил положительную реакцию с поликлональными антителами кролика к дисферлину. Вестерн блот анализ клеток показал наличие выраженной полоски, соответствующей ожидаемой молекулярной массе белка дисферлина (231 кДа).

Таким образом, нами была показана функциональность полученной конструкции. Полученная плазмидная конструкция будет использована в дальнейших исследованиях по разработке методов генной терапии дисферлинопатии человека.

S05-36

ТРКВ-ОПОСРЕДОВАННОЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ И НЕЙРОПРОТЕТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА (BDNF)

Сахарнова Татьяна Александровна¹, Мухина Ирина Васильевна¹, Митрошина Елена Владимировна¹, Ведунова Мария Валерьевна², Астраханова Татьяна Александровна²

¹ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрав РФ, Нижний Новгород, Россия, ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Гипоксия - один из основных факторов поражения головного мозга при ишемии. Внутриклеточные реакции, запускаемые кислородным голоданием связаны с разобщением окислительного фосфорилирования, нарушением энергетики клетки, активацией свободно-радикальных процессов и стимуляцией апоптоза в клетках. Особо губительно кислородное голодание сказывается именно на нервной системе, где потеря даже нескольких элементов нейронной сети может вызвать необратимую деструкцию всей функциональной единицы. Возможность защиты клеток головного мозга от последствий кислородного голодания одна из важнейших проблем современной нейробиологии. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) способен активно изменять метаболизм клеток нервной системы в позднем постнатальном периоде и может рассматриваться как фактор защиты в условиях кислородного голодания. В связи с этим, целью исследований стало изучение нейропротективных и антигипоксических эффектов нейротрофического фактора головного мозга, а также возможных молекулярных механизмов защитного действия BDNF.

Исследования проводились на первичных диссоциированных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии CBA. Моделирование нормобарической гипоксии осуществлялось на 14 день развития путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Исследование функциональной активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа осуществлялось с использованием мультieleктродной системы MEA60 (MultichannelSystems) и кальций-чувствительного красителя OregonGreen (Invitrogen) в течение 7 дней после воздействия гипоксии. Для оценки активации экспрессии мРНК NF-κB1 использовались РНК-зонды (SmartFlare, MerckMillipore). Использование РНК-зондов позволяет прижизненно исследовать активацию гена и появление в цитоплазме мРНК. Каждый РНК-зонд состоит из золотой наночастицы, конъюгированной с многочисленными копиями двунитевого олигонуклеотида, в котором одна нить ("репортерная нить") включает флуорофор, блокированный золотой наночастицей. При контакте РНК-зонда со своей РНК-мишенью, одна из нитей олигонуклеотида связывается со своей комплементарной "захватывающей" нитью и заменяет репортерную нить. Репортерная нить диссоциирует, флуорофор, который теперь разблокирован, флуоресцирует и может быть детектирован. Жизнеспособность клеток в культуре исследовалась в течение 7 дней после моделирования гипоксии, с использованием пропидиум иодида (Sigma) для подсчета мертвых клеток и бис-бензидимида (Sigma) для определения общего количества клеток. В наших исследованиях показано, что BDNF обладает ярко выраженными антигипоксическими и нейропротективными свойствами. Показано сохранение спонтанной биоэлектрической активности, регистрируемой на мультieleктродных матрицах во время моделирования гипоксии и в отдаленном постгипоксическом периоде (рис.1).

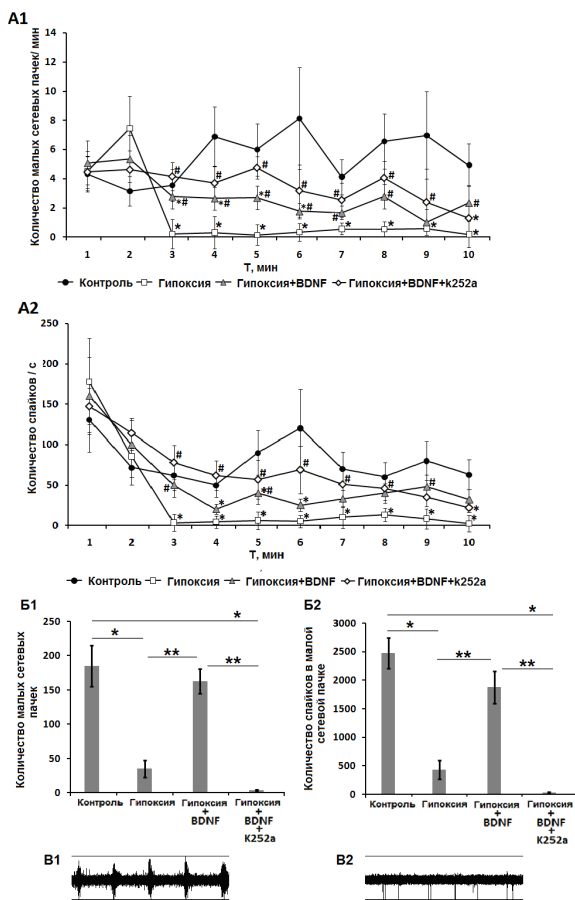


Рис.1 Показатели спонтанной биоэлектрической активности первичных диссоциированных культур гиппокампа: А – во время моделирования гипоксии, А1- количество малых сетевых пакетов за минуту, А2 – количество спайков в секунду; Б – через 7 дней после воздействия гипоксии, Б1 – количество малых сетевых пакетов за 10 минут записи, Б2 – количество спайков в малой сетевой пакете; В – пример записи с одного электрода: В1 – контроль, В2 – после гипоксии.

При исследовании функциональной кальциевой активности также показано сохранение количества клеток, проявляющих спонтанную биоэлектрическую активность через 7 дней после моделирования нормобарической гипоксии (рис.2).

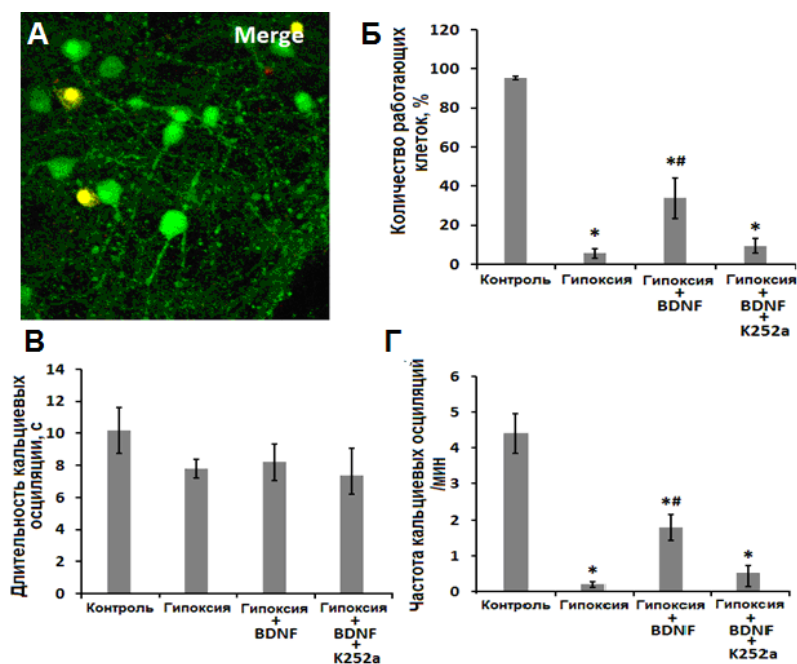


Рис. 2 Показатели функциональной кальциевой активности первичной диссоциированной культуры гиппокампа: А – пример кальциевого имиджинга (зеленый – OregonGreen, желтый – пропидиум иодид), Б – количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность; В – длительность кальциевых осцилляций; Г – частота кальциевых осцилляций.

Эффект, опосредованный BDNF, в нервной системе связывается с двумя типами мембранных рецепторов: низкоафинным рецептором к NGF (low-affinity nerve growth factor receptor, LINGFR), или p75, и высокоафинным тирозинкиназным рецептором В – TrkB. Сила связывания с этими двумя типами рецепторов различна. В наших исследованиях мы показали, что все антигипоксические (выживаемость клеток в диссоциированной культуре) (рис. 3) и нейропротективные (сохранение спонтанной биоэлектрической и кальциевой активности) связаны с реакциями, стимулируемыми связыванием BDNF с TrkB.

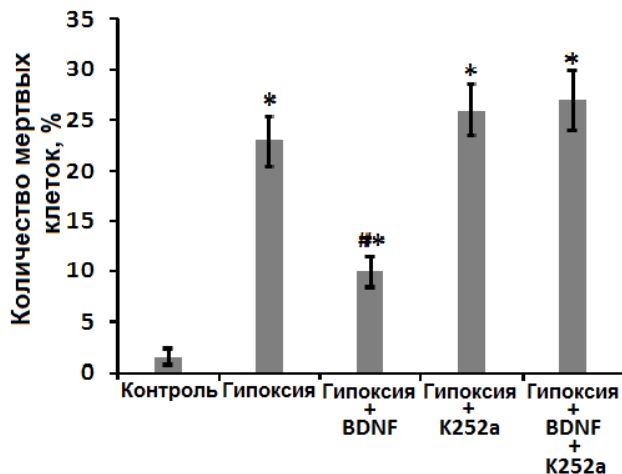


Рис. 3 Процент мертвых (пропидиум иодид положительных клеток) в первичной диссоциированной культуре гиппокампа.

Блокада TrkB полностью блокирует все положительные эффекты превентивного введения BDNF. Кроме того, при использовании селективного блокатора TrkB наблюдается тенденция к более выраженной деструкции структурно-функциональной организации нейронных сетей, чем при нормобарической гипоксии. Это связано с тем, что применение антагониста TrkB блокирует связывание эндогенного BDNF с рецептором. Мы предположили, что положительные эффекты BDNF при гипоксии связаны с активацией NF-kB1. Белки семейства NF-kB1 играют особую роль в реализации торможения апоптоза в клетках. Считается, что активация NF-kB наряду с рядом других факторов (c-jun, cIAP1) является основными тормозящими апоптоз факторами (Bogdaletal., 2013). Проведенные исследования показали, что добавление BDNF стимулирует синтез мРНК NF-kB1 (рис. 4) в клетках первичной диссоциированной культуры гиппокампа. Однако при гипоксии не выявлено увеличение синтеза BDNF. Применение BDNF или антагониста TrkB не вызывает изменение синтеза мРНК NF-kB1.

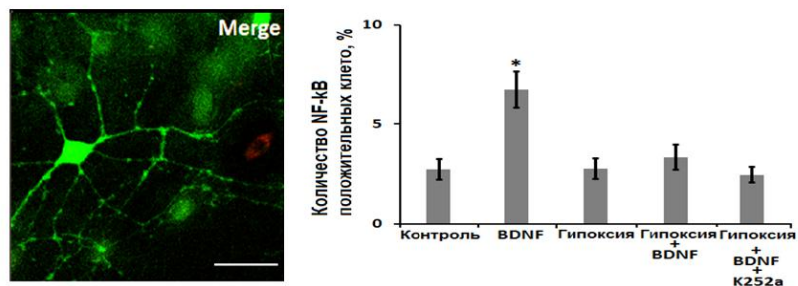


Рис. 4 Количество мРНК-положительных клеток (%) в первичной диссоциированной культуре гиппокампа (справа). Пример совмещения кальциевого имиджинга (зеленый – OregonGreen) и флюоресцентных мРНК зондов NF-kB1 (красный - SmartFlare) (слева).

Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, грантом (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОН РФ и ННГУ), частично базируется на работе, финансируемой Сколковским институтом науки и технологий (Сколтех) в рамках SkolTech/MITInitiative № 203 - MRA

S05-37**КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОДДЕРЖИВАЕТ ВЫЖИВАНИЕ НЕЙРОНОВ СПИНАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ L5 ПОСЛЕ ТРАВМЫ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ****Масгутова Галина Андреевна¹, Масгутов Руслан Фаридович², Салафутдинов Ильнур Ильдусович¹, Журавлева Маргарита Николаевна¹, Ризванов Альберт Анатольевич¹****¹ФГАОУВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия, ²ГБУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», г. Казань, Россия**

С целью стимуляции посттравматической регенерации в периферической нервной системе перспективным представляется изучение мезенхимных стволовых клеток (МСК) полученных из жировой ткани.

В работе произведена оценка реакции нейронов спинального ганглия L5 после аутонервной вставки седалищного нерва крысы длиной 10 мм и интраоперационном введении МСК полученных из жировой ткани человека.

Показано, что через 65 суток после операции общее количество нейронов спинального ганглия L5 в группе с введением МСК на 53,44% ($P < 0,05$) выше по сравнению с группой животных с аутонервной вставкой без введения МСК.

Количество NF- τ^+ -нейронов (нейроны большого и части среднего диаметра) в группе с введением МСК на 23,97% ($P < 0,05$) превышает аналогичный показатель в группе с аутонервной вставкой без введения МСК.

Таким образом, мы можем заключить, что ксенотрансплантация МСК полученных из жировой ткани человека поддерживает выживание нейронов спинального ганглия L5 после травмы седалищного нерва крысы.

S05-38**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ГИПОТИРЕОЗ И АУТОТРАНСПЛАНТАЦИЯ
ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ****Михайличенко В.Ю., Василянская О.В.****ГУ "Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины",
Донецк, Украина**

В эксперименте на хирургической модели гипотиреоза, выполненной на 30 крысах самках линии Вистар, продемонстрированы патофизиологические процессы происходящие у животных иммунной системе и функционировании сердца. У крыс с моделью гипотиреоза, значительно снижается число сердечных сокращений в покое, стресс-имитирующая нагрузка приводит к ишемическим явлениям в миокарде, нарушению ритма сердца и гораздо низким ответом сердечной мышцы по сравнению с интактными животными. При ультразвуковом исследовании сердца у крыс с гипотиреозом наблюдается увеличение левых отдела сердца и снижение сократительных способностей миокарда. Гипотиреоз у животных приводит к снижению функциональных резервов кислородзависимой биоксидности нейтрофилов, на фоне повышения метаболических оксидативных процессов (ДК, МДА), сопровождающийся снижением уровня глутатиона. Параллельно с этим развиваются процессы эндотоксикоза, сопровождающиеся повышением МСМ. Все вышеперечисленные процессы происходят на фоне повышения концентрации ТТГ и снижения Т3, Т4. Патофизиологические изменения в организме приводят к 100% смертности животных при отсутствии лечения, по всей вероятности в основном от сердечной недостаточности. Аутоотрансплантация ткани щитовидной железы в переднюю брюшную стенку позволяет добиться эутиреоидного состояния в течении 3-4 месяцев. Несмотря на то, что часть аутоотрансплантата замещается соединительной тканью, оставшаяся эндокринная часть позволяет адекватно корректировать гормональный статус.

S05-39**ОБОСНОВАНИЕ ТРАНСЭНДОМИОКАРДИАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ
АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ
РЕФРАКТЕРНОЙ СТЕНОКАРДИИ****Эстрин С.И., Михайличенко В.Ю., Кравченко Т.В.*****ГУ "Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН
Украины", Донецк, Украина***

В работе проанализирован опыт интракоронарного и трансэндокардиального введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) у пациентов с рефрактерной стенокардией. Все больные ранее перенесли реваскуляризирующие операции: 27 (60%) - аортокоронарное шунтирование (АКШ), 12 (26,7%) – стентирование коронарных артерий и 7 (15,6%) – АКШ+стентирование. Аутологичные МСК вводили интракоронарно в дозе 50 млн клеток. При УЗДГ в 1 группе в течении всего исследования отмечалось снижение ФВ ЛЖ до $23,2 \pm 5,2\%$, во 2 группе отмечалось повышение ФВ с $31,2 \pm 7,1$ до $37,4 \pm 5,2\%$ при $p \leq 0,05$ и к сроку 6 месяцев начинала снижаться. В данный период времени у пациентов снижались дозы применяемых препаратов, отмечалось усиление толерантности к физической нагрузке, подтверждаемая нами по тредмил-тесту. При картировании сердца на навигационной системе NOGAXP, мы отметили, что амплитуда униполярного сигнала после введения МСК увеличилась с 7,8-8,7 мВ до 9,0-9,4 мВ в передне-латеральной зоне и с 5,3-12,0 до 7,9-14,1 мВ в задне-септальной соответственно. К сожалению эффект трансплантации аутологичных МСК не длительный и в срок 12 месяцев постепенно нивелируется, тем не менее возможно повторных введение клеток и возобновлять эффект клеточной кардиомиопластики. Следует отметить, что трансэндокардиальное введение клеточного трансплантата позволяет достичь лучших результатов, чем интракоронарное введение.

S05-40

**ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELL FOR AUTOLOGOUS CELL THERAPY:
 DISTURBED ANGIOGENIC ACTIVITY IN PATIENTS WITH CORONARY
 ARTERY DISEASE AND DIABETES MELLITUS TYPE 2**

A.Yu. Efimenko^{1,2}, N.A. Dzhoyshevili², T.N. Kochegura¹, N.I. Kalinina², M.V. Shestakova³, R.S. Akchurin⁴, Ye.V. Parfyonova^{2,4}

¹ Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation. ² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation. ³ Institute of Diabetes Mellitus, Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation. ⁴ Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russian Federation.

Multipotent mesenchymal stem/stromal cells (MSC) including adipose-derived stromal cells (ADSC) have been successfully applied for cardiovascular diseases treatment. Their regenerative potential is considered due to proliferation and differentiation capacities, paracrine activity and immunologic privilege. However, therapeutic efficacy of autologous MSC for myocardial ischemia therapy is modest. We analyzed if ADSC properties are attenuated in patients with chronic diseases such as coronary artery disease (CAD) and diabetes mellitus type 2 (T2DM).

ADSC were isolated from subcutaneous fat tissue of patients without established cardiovascular diseases and metabolic disorders (control, n=19), patients with CAD only (n=32) and patients with CAD and T2DM (n=28). ADSC phenotype was CD90+/CD73+/CD105+/CD45-/CD31- and they were capable of adipogenic and osteogenic differentiation. ADSC morphology and immunophenotype were similar for all patients, but ADSC from patients with CAD and T2DM had higher proliferation activity and shorter telomeres compared to the control group.

ADSC conditioned media stimulated capillary-like tubes formation by endothelial cells, but this effect significantly decreased for patients with CAD (p=0.03) and with CAD+T2DM (p=0.017) compared to the control group. Surprisingly we revealed significantly higher secretion of some pro-angiogenic factors by ADSC: vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) for patients with CAD and HGF and placental growth factor (PIGF) for patients with CAD+T2DM. Among angiogenesis inhibitors such as thrombospondin-1, endostatin and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) level of PAI-1 in ADSC conditioned media was significantly higher for patients with CAD and CAD+T2DM compared to the control group (p<0.01). Inhibition of PAI-1 in ADSC conditioned media by neutralizing antibodies partially restored ADSC angiogenic activity (p=0.017).

Taken together ADSC angiogenic activity is significantly declined in patients with CAD and T2DM which could restrict the effectiveness of autologous ADSC cell therapy in these cohorts of patients. This impairment might be due to the disturbance in coordinated network of pro- and anti-angiogenic growth factors secreted by ADSC.

S05-41**ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ КСЕНОГЕННОГО ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА С ДОБАВЛЕНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА rhBMP-2**

А.В. Громов¹, М.С. Бартов¹, У.Ф. Мухаметов², К.Е. Никитин¹, Д.М. Савина¹, Э.Б. Макарова², Е.В. Разумкина¹, Т.М. Грунина¹, Л.А.Соболева¹, М.Е.Субботина¹, А.С.Семихин¹, Ф.Ф. Мухаметов², В.Г. Лунин¹, А.С. Карягина¹

¹ ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, г. Москва; ² ГБУЗ РКБ им. Г.Г.Куватова, г. Уфа; ³ ФГБУ «УНИИТО им. В.Д.Чаклина» Минздрава РФ, г. Екатеринбург

Одним из путей повышения регенеративного потенциала имплантируемых материалов является создание препаратов нового поколения, содержащих факторы роста костной ткани, основными из которых являются костные морфогенетические белки (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs).

BMP вовлечены в каждый аспект биологии кости и являются важнейшими факторами роста и регенерации кости. Согласно результатам клинической апробации, материалы, содержащие BMP, не уступают по остеоиндуктивности аутологичному костному материалу или превосходят их. Однако остается ряд нерешенных проблем: выбор эффективной технологии получения BMP, разработка пролонгированной формы препарата, выбор адекватного носителя BMP.

В институте Гамалеи разработана технология получения остеопластических материалов нового поколения «Гамалант» на основе ксеногенного деминерализованного костного матрикса (ДКМ) с добавлением рекомбинантного белка человека rhBMP-2. ДКМ получали по оригинальной технологии с биохимическим контролем эффективности процессов обработки. Биологическая активность полученного препарата rhBMP-2 *in vitro* и *in vivo*, не уступала таковой зарубежных коммерческих аналогов. Создана широкая линейка материалов: костная крошка различных размеров, блоки, мембраны и др.

Регенеративный потенциал разработанных материалов оценивали на моделях эктопического остеогенеза и краниальных дефектов у крыс биохимически, гистологически и томографически. Материалы «Гамалант» демонстрировали высокую биосовместимость и остеоиндуктивность.

В ГБУЗ РКБ им. Г.Г.Куватова (г. Уфа) проведено клиническое исследование эффективности применения материалов «Гамалант» для лечения нестабильных компрессионных переломов грудных и поясничных позвонков. Двухэтапное оперативное лечение включало транспедикулярную фиксацию с реклинацией позвоночника и декомпрессирующей ламинэктомией по необходимости с последующим передним корпородезом с костной аутопластикой с применением (30 человек, группа №1) и без применения (140 человек, группа №2) материалов «Гамалант». В группе №1 костная мозоль была сформирована к 6 месяцам в 100% случаев; в группе №2 в 7 случаях отмечалось формирование ложного сустава, к 6 месяцам костная мозоль была сформирована лишь у 50% пациентов, что свидетельствует о перспективности разработанных материалов для применения в клинике.

S05-42**TIME-LAPSE ВИЗУАЛИЗАЦИЯ 2D И 3D КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР****Струкова Л.А.****ООО "Квадрос-Био", г. Москва, Россия**

Для полноценного анализа клеточных культур требуется оборудование, которое позволяет следить за их ростом в динамике (time-lapse анализ, с заданной периодичностью). При этом желательно иметь возможность получения качественных изображений и экспорта видеофайлов. Традиционно за культурами наблюдают с помощью настольных микроскопов, при этом клетки каждый раз приходится переносить из инкубатора, подвергать температурным колебаниям и механическим вибрациям, определять место предыдущего сканирования. Климатические камеры современных микроскопов частично решают эту задачу. Несомненно, есть скрининговые приборы, которые могут поддерживать режимы температуры и влажности и заданную концентрацию газов, однако они обладают низкой вместимостью (1-2 планшета) и, как правило, поддерживают только планшетный формат.

Компания "Квадрос-Био" представляет в России интерактивный микроскоп для инкубатора IncuCyte Zoom, который устанавливается в стандартный клеточный инкубатор, обладает высокой вместимостью пластика различного вида, автоматически фокусируется и делает снимки с заданной периодичностью, обрабатывает информацию и выдает графические результаты. За экспериментами можно наблюдать в режиме реального времени удаленно по локальной сети, а не только в клеточном блоке.

У IncuCyte Zoom есть возможности фазово-контрастной и флуоресцентной съемки. В перечень исследований, проводимых с помощью прибора, входят наблюдение за процессами пролиферации, цитотоксичности, апоптоза, формирования колоний, активации репортерных генов, дифференцировки стволовых клеток, миграции и инвазии, ангио- и нейrogenеза и др. Популярное направление исследования 3D-культур, моделирующих ткани, расширяет возможности регенеративной медицины и тестирования химических веществ. Используя IncuCyte Zoom, можно следить за формированием и изменением 3D культур в динамике. Прибор с заданной периодичностью получает изображения сфероидов, обчисляет размеры и интенсивность флуоресцентного свечения.

Адаптированные протоколы упрощают постановку экспериментов. Результаты легко экспортируются в различные форматы, изображения и графики переносятся в текстовые документы или программы для создания презентаций. Любая серия снимков преобразуется в видеозапись.

Специальные устройства и программные модули в комплектации IncuCyte Zoom упрощают клеточный анализ, минимизируя затраты времени и внимания исследователей.

S06-01

BIOLOGICAL MEMBRANES AS STRUCTURAL/DYNAMIC TEMPLATE FOR NEW NANOMATERIALS: INSIGHTS FROM COMPUTER SIMULATIONS

R.G. Efremov

M.M. Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997, Russia;

The concept of the membrane as a two-dimensional homogeneous mixture of lipids, proteins, and other components should be reconsidered based on modern experimental and computational data. Cell membranes are rather heterogeneous in their physicochemical properties, contain a wide variety of domains differing in size, composition, lifetime, and so on. In addition, these systems are highly dynamic and manifest large-scale fluctuations even in equilibrium. It is noteworthy that the above said phenomena occur not only in such multicomponent systems like cell membranes, but also in rather simple model membranes - one- and two-component lipid bilayers. Complex character of cell membranes seems to be a fundamental intrinsic property, which plays a vital role in their biological functioning – response to external signals (e.g., insertion of membrane peptides, proteins and other molecules; changes of temperature, pH, ionic strength; mechanistic exposure, and so on).

Analysis of local heterogeneities and collective moves in model lipid bilayers is an important step toward understanding of the physical processes underlying formation of lipid domains and rafts and molecular mechanisms of the so-called “membrane response” observed upon binding of external molecules to cell membranes. Atomistic computer modeling represents a powerful tool to address these problems. In this work, we used molecular dynamics simulations of a series of one- and two-component hydrated lipid bilayers of different composition to study lateral clustering of lipids, water dynamics and local correlated moves of the membrane components (1-3). Also, the effects of lipid-water environment on membrane proteins and their interactions were thoroughly investigated (4-5). The results obtained permit delineation of the main factors determining on the molecular level structural and dynamic “portrait” of lipid bilayers with a particular lipid composition and the role of heterogeneous membrane medium in structural organization and functioning of proteins.

Further extrapolation onto living cells suggests that these phenomena are much more important in a case of real cell membranes – their nontrivial composition (hundreds of different types of lipids and other compounds!) permits regulation of physico-chemical properties in a wide range. This makes the biological membranes ready for fast and adequate response to external signal like protein binding/insertion, changes of temperature, pressure, ion composition, and so on. Furthermore, this opens wide perspectives of rational design of new nanomaterials, which combine fine-tuning regulation and adaptability inherent in biological membranes with robustness of artificial chemical films and porous coatings.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Scientific Foundation, Russian Foundation for Basic Research, RAS Programs “Basic fundamental research for nanotechnologies and nanomaterials” and “Molecular and cell biology”. Access to computational facilities of the Joint Supercomputer Center RAS (Moscow) is gratefully acknowledged.

References:

1. Polyansky A.A. et al., (2009). J. Phys. Chem. B. 113, 1107.
2. Pyrkova D.V. et al., (2011). Soft Matter 7, 2569.
3. Krylov N.A. et al., (2013). ACS Nano 7, 9428.
4. Polyansky A.A., et al. (2012) J. Amer. Chem. Soc. 134, 14390.
5. Volynsky P.E. et al., (2013) J. Amer. Chem. Soc. 135, 8105.

S06-02

COMPLEXES OF BIOMOLECULES WITH METAL NANOPARTICLES

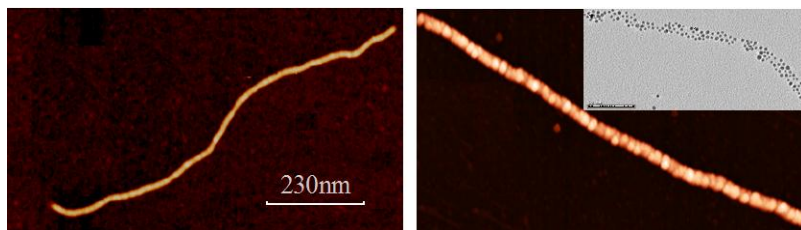
Kotlyar A.B., Eidelshtein G.

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, George S. Wise Faculty of Life Sciences and
 The Center of Nanoscience and Nanotechnology, Tel Aviv University, Ramat Aviv 69978, Israel*

Complexes of biopolymers with metal nanoparticles can transport electrical current and serve as construction component in molecular electronic devices and nanosensors.

We have developed novel methods for coating double stranded (ds) DNA and lamellar bacteriophage M13 with gold nanoparticles (AuNPs). Complexes between the above biopolymers and metal nanoparticles were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) and Transient Absorption Microscopy (TEM).

To enable efficient binding of AuNPs to the templates DNA and bacteriophages were functionalized by sulfur-containing groups. SH-groups were introduced into the bacteriophage by modification of NH₃-groups of its envelope protein with Trout's reagent. The DNA molecules containing S-residues along their backbone were enzymatically synthesized from a mixture of normal and 1-thio-deoxynucleotide triphosphates (dCTP and dGTP) by Klenow fragment of DNA polymerase I as described in our earlier studies [1-3]. Both the S-modified DNA and the bacteriophage (see Fig. below) efficiently bind AuNPs and yield long chains of nanoparticles upon incubation with AuNPs.



AFM images of bare (left panel) and AuNP-coated (right panel) phage M13 and TEM image of the phage-nanoparticle complex (inset) of the bacteriophage-AuNPs complex.

[1] A. Kotlyar, N. Borovok, T. Molotsky, L. Fadeev, M. Gozin (2005) Nucl. Acid Res. 33, 525;

[2] A. Kotlyar, N. Borovok, T. Molotsky, D. Klinov, B. Dwir, E. Kapon (2005) Nucl. Acid Res. 33, 6515;

[3] N. Borovok, N. Iram, D. Zikich, J. Ghabboun., G. Livshits, D. Porath and A. Kotlyar (2008) Nucl. Acid Res. 36, 5050.

S06-03

MESOPOROUS SILICON NANOPARTICLES AS THE VERSATILE TOOL FOR THE TARGETED DELIVERY OF BIOACTIVE MOLECULES WITH LOW BIOAVAILABILITY

Ale Närvänen

School of Pharmacy; University of Eastern Finland

Mesoporous silicon (PSi) nanoparticles are based on pure elementary silicon. They are versatile platform for targeted multifunctional therapy. The electrochemical synthesis of PSi allows construction of pore sizes and volumes that are controllable from the size of microns to nanometers. The optimal size range of the mesoporous nanoparticles as carriers for bioactive molecules is 100 – 300 nm with the pore size of 10 – 20 nm. PSi-particles have shown to be optimal for controlled drug release and increased drug solubility. PSi has several advantages, such as, high payloads, improved dissolution, reduced pH dependence of dissolution, sustained release, improved permeation, stabilization of the payload structure and protection of the payload against degradation or fast turn over. Since PSi-particles have also shown to be biocompatible and non-toxic, they have potential for the delivery of a great variety of therapeutic molecules.

The relative high hydrophobicity of the backbone of the particles allows the loading of highly hydrophobic molecules. In addition, PSi-particles are optimal for bio-organic modification. The surface of the pores and outer surface of the particles are grafted with chemically active groups like primary amine or carboxylic acid or as a combination of both. Using different active groups we have modulated the net charge of the particles and loaded the particles with several types of bioactive molecules like IGF-1 hormone¹, oligonucleotides with cell penetrating peptides (CPP)² and several small pharmaceutical molecules. Furthermore, the active groups permit chemical conjugation of targeting molecules like antibodies³ or avidin mediated biotinylated moieties. The modified nanoparticles are internalized into the cells via endocytotic pathway. The release of the cargo occurs in the lysosomal system but using factors like CPP, the molecules are released into the cytoplasm and nucleus. Using targeting moieties together with wide variety of therapeutic molecules, PSi particles provide an excellent tool for the specific therapy with reduced side effects.

1Huhtala T et al. J Drug Delivery 2012, 1-8.

2Rytkönen J et al. Mol Pharm. 2014, 11(2), 382-390.

3Rytkönen et al. J Nanomaterials.2012, 1-9.

S06-04**SMART CONTAINERS FOR DRUG DELIVERY AND UNCONVENTIONAL COMPUTING****Laura Pastorino*****Department of Informatics, Bioengineering, Robotics and Systems Engineering; University of Genova, Genova, Italy***

Nanoengineered polyelectrolyte capsules (NPCs) are regarded as very promising nanosystems for the targeted delivery and triggered release of molecules encapsulated in their hollow void [1]. NPCs have been proposed for a broad range of applications including drug delivery, biosensors, bioreactors and artificial cells [2]. Recently, they have also been proposed for their use in unconventional computational networks.

NPCs are fabricated through the layer-by-layer assembly of a multilayered shell onto a sacrificial nano/micro-particle core. Once the multilayered shell is assembled, the core is dissolved to obtain hollow NPCs, which can be loaded with specific molecules by the variation of the shell permeability.

It is then possible to deliver the encapsulated molecules to a target point and trigger their release by the nanoscale-design of the multilayered shell. Targeting can be achieved by an external magnetic field acting on magnetic NPCs or by specific molecular interactions occurring at the interface between the NPCs external surface and the target site. Once the target site has been reached, release can be induced by a stimulus either internal (e.g. pH variation) or external (e.g. light illumination) to the system under development.

Such action will allow to vary the local properties of the system, such as the pathological state of a cell, or to catalyse-inhibit a reaction in a chemical or bio-chemical unconventional computer system.

[1]. G. Sukhorukov, et al. *Polymers for Advanced Technologies* 1998, 9, 759-767.

[2]. L. Pastorino, S. Erokhina, and V. Erokhin. *Curr. Org. Chem.*, 2013, 17, 58-64.

S06-05

CELL SURFACE ENGINEERING: RECENT ADVANCES IN FABRICATION AND APPLICATIONS OF CYBORG CELLS

Rawil F. Fakhrullin

Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Within the recent years, an emerging technique of cell surface engineering has attracted the enormous attention of researchers worldwide, due to its significance in such important areas as tissue engineering, biosensing, microelectronics, and cell delivery, among many others. Cell surface engineering is the chemical technology aimed to deliberately modify, attenuate, functionalise or otherwise alter the nanoscale surface chemistry and topography of cells and/or viruses using the directed deposition of biomacromolecules and/or nanomaterials as artificial shells deposited via a controllable way onto cell surfaces. The ultimate goal of cell surface engineering is the fabrication of engineered coatings on the cell walls or cellular membranes of biological cells without modifying the genome of the cells, using purely chemical approaches. Cells possessing artificially deposited coatings or functional cells are defined as “cyborg” cells.

Currently, several methods of functionalisation of living cells with nanomaterials exist. Layer-by-layer assembly of nanofilms and nanoparticles is one of the most popular approaches for modification of microbial and human cells. Cells have been successfully coated using a variety of functional nanomaterials, including polyelectrolyte nanofilms, metal and oxide nanoparticles, carbon nanotubes and graphene oxide nanosheets, etc. Fabrication of artificial inorganic coatings is yet another peculiar approach of cell surface engineering, based on the deposition of egg-like shells built from solid inorganic materials, such as calcium carbonate.

“Cyborg” cells have found numerous applications in microelectronics, tissue engineering, fabrication of biosensors and biotechnology. Particularly important are the biomedical applications and nanotoxicity studies of “cyborg” cells. The major aspects of the cells nanocoating will be covered in this talk. Particularly, the talk will be focused on fabrication of magnetic human cells for tissue engineering and application of “nanobait” cells for nanotoxicity studies using multicellular microworms. The perspectives of the future research in cell surface engineering will be overviewed. Herein the recent advances in cell surface engineering, namely fabrication of halloysite-coated microparticles based on microbial cells, preparation of magnetic human cells for tissue engineering and a novel approach to test the toxicity of nanomaterials using “nanobaits” are reported. Halloysite nanotubes were deposited onto cells via the LbL polymer shell assembly, while magnetic and silver polymer-coated nanoparticles were attached to cell membranes via the direct deposition approach. The practical applications of these technologies in cells mechanical protection, tissue engineering and nanotoxicity studies using *C. elegans* are reported and discussed.

[1] R.F. Fakhrullin et al., Chemical Society Reviews, 41, 4189 (2012).

S06-06

НОВЫЕ НАНОРЕГУЛЯРНЫЕ И НАНОРАЗМЕРНЫЕ МЕТАЛЛ-АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МЕДЬ (II) И НИКЕЛЬ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кельцьева О.А.^{1,4}, Шустов В.Э.¹, Мозгушин И.А.¹, Чернова Е.Н.³, Русских Я.В.³, Суходолов Н.Г.², Селютин А.А.², Подольская Е.П.^{1,4}

¹ФГБУН Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; ³ФГБУН Российской академии наук Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия; ⁴ФГБУН Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия.

Металл-аффинная хроматография – важный аналитический инструмент для предварительной обработки образца перед анализом. Метод основан на различном сродстве гетероатомов органических соединений к ионам металлов. Сорбенты, содержащие в своем составе медь (II) и никель могут быть использованы для анализа соединений, в функциональные группы которых входит азот, кислород или сера.

Недавно был предложен метод синтеза наноразмерных пористых оксидов металлов, и был получен металл-аффинный сорбент на основе оксида железа (III). Кроме того, было показано, что такие регулярные наноструктуры как пленки Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ) на основе стеарата железа (III) могут быть использованы в качестве металл-аффинного сорбента. Следовало ожидать, что как оксиды, так и ПЛБ, содержащие двухвалентные металлы, также могут проявлять сорбционные свойства.

Были получены два типа сорбентов: наноразмерные CuO и NiO и, сформированные по методу Ленгмюра—Блоджетт, монослоистеарата меди(II) и стеарата никеля. Показано, что сорбенты проявляют ярко выраженные металл-аффинные свойства по отношению к соединениям, содержащим атомы азота, серы и галогенов. Кроме того, сорбенты устойчивы в растворителях, используемых в классическом металл-аффинном анализе, и их сорбционная емкость не уступает коммерческим аналогам.

Для проверки специфичных свойств сорбентов использовали экстракт из биомассы цианобактерий, содержащий ряд биологически-активных метаболитов цианобактерий (микроцистины и анабенопептины). Сорбцию проводили в кислой среде. Элюцию осуществляли методом последовательной обработки сорбента растворителями различной элюирующей силы. В результате было получено разделение ряда микроцистинов и других природных соединений по фракциям. Кроме того, с помощью метода MALDI-MS было показано, что на разработанных сорбентах могут быть разделены соединения, относящиеся к классу микроцистинов и обладающие одинаковой (или близкой) молекулярной массой, но различающиеся по структуре, что было подтверждено методом тандемной масс-спектрометрии. Особого внимания заслуживает тот факт, что данные сорбенты могут быть использованы для экстракции лекарственных препаратов, содержащих в своем составе атомы азота и галогенов, что было показано на примере диклофенака, ципрофлоксацина, триклозана.

S06-07

SUPRAMOLECULAR COMPLEX FORMED BY DNA OLIGONUCLEOTIDE AND THIACALIX[4]ARENE. NMR-SPECTROSCOPY AND MOLECULAR DOCKING

Bulat Khairutdinova^a, Elena Ermakova^a, Aleksandr Sitnitsky^a, Ivan Stoikova^b, Yuriy Zueva^b

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan 420111, P.O. Box 30, Russian Federation; ^bKazan Federal University, Kazan 420111, Kremlevskaya Str., 18, Russian Federation

The combination of NMR-spectroscopy and molecular docking was applied to investigate the complexation of thiacalix[4]arene with DNA. We have studied the structure of supramolecular complex formed by palindromic decamer DNA d(GCGTTAACGC)₂ and tetrasubstituted at lower rim of p-tert-butyl thiacalix[4]arene in 1,3-alternate conformation. With the help of NMR it is shown that oligonucleotide in solution exists in two states: double-stranded helix (dominant structure in solution) and single-stranded form (minor structure) rolled up in a “hairpin” with equilibrium between them. Both complementary methods, NMR and molecular docking, revealed the formation of molecular complex by thiacalix[4]arene and palindromic decamer DNA. Different possible conformations of the complexes were analyzed by means of molecular docking. We used the experimental constraints in molecular docking to identify the complexes, which were in agreement with the NMR data.

The work was supported by the grant from RFBR N 13-04-97061_volga-region.

S06-08**СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ****Мингалеева Р.Н., Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А.*****Казанский (Приволжский) федеральный университет***

Исследование стволовых опухолевых клеток (СОК) является приоритетным направлением современной онкологии. Это обусловлено тем, что именно СОК ответственны за процесс метастазирования опухоли, рецидив заболевания и развитие резистентности к химиотерапии. Для поиска новых противораковых препаратов необходимо тестирование эффективности кандидатов на популяции СОК. Выделение чистой популяции СОК осложнено немногочисленностью этих клеток в гетерогенной опухоли, трудоемкостью процесса выделения и контроля дифференцировки СОК *in vitro*. Целью нашей работы является создание клеточных линий на основе мезенхимальных стволовых клеток, генетически модифицированных лентивирусными конструкциями, которые содержат онкогены, предположительно ответственные за лекарственную устойчивость стволовых опухолевых клеток. Создание линии стволовых клеток, приближенных по своим характеристикам к опухолевым, позволит нам повысить эффективность и ускорить процесс поиска новых противораковых препаратов.

S06-09

ИЗМЕНЕНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОСТРУКТУР РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Н. Ф. ШУРШАЛОВА¹, О. Г. ШАПОВАЛ², О. В. Нечаева³, Т. А. Шульгина⁴

¹ГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия, ²ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия, ³ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия, ⁴ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, Саратов, Россия

Адгезия является стартовым этапом взаимодействия микроорганизмов с клетками макроорганизма, поэтому изучение влияния на этот процесс различных факторов, в том числе и наноструктур, представляет практический и теоретический интерес.

Целью исследования послужила оценка влияния наночастиц серебра (куб с гранью 20 нм) и многостенных углеродных нанотрубок (длиной 0,5-1мкм и диаметром 10-20нм) - МУНТ на адгезивную активность грамотрицательных бактерий – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* 113-13, а также 4 клинических изолятов каждого вида (*P.aeruginosa* и *E.coli* №№1-4).

Предварительно методом серийных разведений установлено ингибирующее влияние наночастиц серебра и стимулирующее влияние МУНТ на рост опытных культур. Для изучения влияния наноструктур на адгезивные свойства бактерий суточные культуры (2×10^8 КОЕ/мл) инкубировали в течение 24ч при 37°C в 1мл мясо-пептонного бульона с ¼ минимальной подавляющей концентрации наночастиц серебра или 1мг МУНТ. Затем на предметное стекло наносили по 10 мкл бульонных культур исследуемых бактерий и 50 мкл суспензии, содержащей 10^8 кл/мл отмытых эритроцитов O(I)Rh(+), перемешивали и инкубировали 30 минут при 37°C во влажной камере, высушивали, фиксировали и окрашивали водным фуксином (Брилис В.И. и др., 1986). При иммерсионной микроскопии рассчитывали индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ) как среднее количество микробов на одном эритроците, участвующем в адгезии. В зависимости от ИАМ микроорганизмы считались низко- (ИАМ 1,76-2,49); средне- (ИАМ 2,5-3,99) и высокоадгезивными (ИАМ > 4).

Установлено, что наночастицы серебра в субингибирующих концентрациях угнетают адгезивную активность всех штаммов исследуемых бактерий: диапазон ИАМ для *P.aeruginosa* – $1,21 \pm 0,41 - 2,92 \pm 0,89$, для *E.coli* $1,36 \pm 0,55 - 1,62 \pm 0,28$ в отличие от контролей (*P.aeruginosa* – $2,92 \pm 0,56 - 5,95 \pm 1,21$ и *E.coli* $2,1 \pm 0,34 - 7,0 \pm 0,93$). Опытная концентрация МУНТ, напротив, стимулирует адгезивную активность обоих видов: ИАМ для *P.aeruginosa* – $3,75 \pm 0,14 - 6,44 \pm 0,46$, *E.coli* – $2,8 \pm 0,38 - 8,42 \pm 0,56$.

Полученные результаты могут быть использованы для создания препаратов с антимикробным действием за счет содержания наночастиц серебра и конструирования высокоадгезивных пробиотических штаммов с использованием МУНТ.

S06-10**САМОРАСПРОСТРАНЯЮЩИЙСЯ МИКРОВОЛНОВЫЙ СИНТЕЗ, КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ОКСИДНЫХ МЕТАЛЛ-АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ**

Селютин А.А.¹, Подольская Е.П.², Суходолов Н.Г.¹, Кельцьева О.А.³, Краснов И.А.², Колоницкий П.Д.¹, Федорова А.В.¹

¹*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия,* ²*ФГБУН РАН Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия,* ³*ФГБУН "Институт токсикологии ФМБА России", Санкт-Петербург, Россия*

В связи с активными исследованиями и широким применением наноразмерных частиц в технике, биологии и медицине появляется необходимость быстрого и дешевого их получения и исследования свойств. Так, например, нанодисперсные оксиды металлов могут быть успешно использованы для специфичной экстракции многих биологически активных соединений, таких как белки, лекарственные препараты, пестициды и др.

В данной работе был разработан новый метод синтеза наночастиц оксидов металлов, основанный на микроволновой обработке водных растворов солей различных металлов в присутствии мочевины. Преимуществом данного метода является получение наноразмерных частиц оксидов металлов в неравновесных условиях. Методами сканирующей электронной микроскопии, измерением удельной поверхности полученных оксидов показано, что в ходе синтеза образуются агрегаты размером около десятка микрон. Под воздействием ультразвука эти агрегаты распадаются до частиц, размеры которых не превышают сто нанометров.

Методом микроволновой обработки водных растворов нитратов соответствующих металлов и мочевины были получены следующие оксиды: ZrO_2 , TiO_2 , Fe_2O_3 , Cr_2O_3 , Al_2O_3 , Bi_2O_3 , ZnO , NiO и CuO . Для всех синтезированных оксидов были определены фазовый состав, размеры частиц, объемное и количественное распределение частиц по размерам, удельная поверхность (методом БЭТ), а также методом СЭМ получены микрофотографии образца. Установлено влияние природы металла на размеры частиц получаемых оксидов. Так, например, в случае оксида алюминия размеры частиц составляют 4-5 нм, 50 нм для оксида цинка и 100 нм для оксида циркония. При этом полученные структуры обладают высокой удельной поверхностью. Все это позволяет использовать нанодисперсные оксиды металлов в качестве эффективных сорбентов.

При исследовании металл-аффинных свойств полученных структур было показано, что оксиды циркония, титана, алюминия и железа могут быть успешно применены в фосфорпротеомике, никеля и меди для выделения ряда белков и лекарственных препаратов, а Bi_2O_3 проявляет специфичные свойства к перфтороктановым кислотам, являющимися сильными канцерогенами.

S06-11

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕМНОВОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ФТАЛОЦИАНИНОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ НАНОНОСИТЕЛЕЙ

Ударцева О.О.1, Лобанов А.В.2, Андреева Е.Р.1, Буравкова Л.Б.1

¹ГНЦ РФ - ИМБП РАН, г.Москва, Российская Федерация, ²ИХФ РАН, г. Москва, Российская Федерация

С середины 80-х годов прошлого века фталоцианины вызывают большой интерес в медицине в качестве фотосенсибилизаторов (веществ, повышающих чувствительность биологических тканей к свету), которые используют для диагностики и лечения ряда онкологических и неонкологических заболеваний с помощью фотодинамического воздействия (ФДВ). Основным недостатком фталоцианинов является их гидрофобность и в некоторых случаях – накопление в подкожно-жировой клетчатке. Для повышения водорастворимости и специфичности доставки фотосенсибилизаторов разрабатываются их наноформы. Наиболее популярными биосовместимыми нано-носителями являются SiO₂ и поливинилпирролидон (ПВП). В настоящей работе на мезенхимных стромальных клетках (ММСК) была проведена сравнительная характеристика темновой цитотоксичности и эффективности нанокompозитных AlCl₃-, Mg-, Zn-фталоцианинов (AlCl₃-, Mg-, Zn-Фц) на основе наноразмерного SiO₂ и ПВП.

ММСК выделяли из изстромально-васкулярной фракции жировой ткани человека и культивировали согласно стандартному протоколу. Нанокompозитные фталоцианины были синтезированы с использованием металлических (AlCl₃-, Mg-, Zn-) комплексов фталоцианинов, ПВП и нано-SiO₂. Чистоту и индивидуальность кристаллических фталоцианинов подтверждали методом MALDI-масс-спектрометрии на приборе Thermo DSQ II. Для изучения темновой цитотоксичности наночастицы, конъюгированные с фталоцианинами, добавляли в среду культивирования в концентрации 0,05-1 мкг/мл. Для проведения ФДВ клетки инкубировали с фотосенсибилизаторами в течение 24 ч. Далее производили смену среды и облучали клетки с помощью диодного лазера (АЗОР ФДВ, Россия) λ=675 нм. Жизнеспособность ММСК анализировали методом МТТ-теста через 24 ч после воздействия.

Нанокompозитные AlCl₃-Фц-SiO₂, Mg-Фц-SiO₂, AlCl₃-Фц-ПВП и Zn-Фц-ПВП в концентрациях 0,1-1 мкг/мл не оказывали влияния на жизнеспособность клеток, в то время как наноразмерные Zn-Фц-SiO₂ и Mg-Фц-ПВП оказывали выраженный цитотоксический эффект на ММСК. При проведении ФДВ было показано, что среди модифицированных фталоцианинов наибольшей фотодинамической активностью обладают AlCl₃-Фц-SiO₂ и Zn-Фц-ПВП, использование которых в низких концентрациях (100-300 нг/мл) обеспечивает высокую эффективность ФДВ.

Работа выполнена при поддержке Стипендии Президента РФ СП-6775.2013.4.

S06-12**МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИММУНОФОТОТОКСИНА 4D5SCFV-MINISOG НА HER2/NEU-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА****Прошкина Г.М., Миронова К.Е., Деев С.М.****ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия**

Развивая направление генетически кодируемых иммунофототоксина для фотодинамической терапии, в нашей лаборатории получен полностью генетически кодируемый иммунофототоксин (Mironova K. et. al., 2013), способный высокоселективно узнавать HER2/neu-положительные раковые клетки человека. В качестве адресного модуля использовано мини антитело 4D5scFv, способное селективно узнавать онкомаркер HER2/neu. В качестве фототоксического модуля взят фотоактивируемый флавопротеин mini SOG (Shu X. et. al., 2011), способный генерировать АФК под действием синего света. В опытах *in vitro* иммунофототоксин 4D5scFv-miniSOG показал высокую специфичность по отношению к HER2/neu - гиперэкспрессирующим раковым клеткам и эффективно снижал их жизнеспособность при облучении (Mironova K. et. al., 2013). Представлялось интересным изучить механизм клеточной гибели, индуцируемый иммунофототоксином.

При наблюдении в микроскоп за клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, подвергшимся обработке иммунофототоксином 4D5scFv-miniSOG и последующему облучению, было замечено, что через 1,5-2 ч после прекращения облучения в клетках происходят морфологические изменения, характерные для некроза: набухание и вакуолизация цитоплазмы, потеря целостности плазматической мембраны.

Для количественной характеристики типа клеточной гибели использовали колориметрический метод определения уровня каспазной активности и цитометрический метод определения доли клеток с фрагментированной хромосомной ДНК (subG1-фракция) в популяции. Оказалось, что в клетках SK-BR-3, обработанных иммунотоксином 4D5scFv-miniSOG, не содержится значимого количества фрагментированной хромосомной ДНК, также отсутствует активность каспазы-3 (сравнима с отрицательным контролем).

Таким образом, отсутствие каспазной активности и фрагментированной хромосомной ДНК, а также характерные морфологические изменения, которые проявляют клетки после воздействия иммунотоксина, позволяют сделать вывод, что 4D5scFv-miniSOG вызывает некроз раковых клеток.

S06-13

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ПРОЦЕСС ИСКУССТВЕННОЙ ТИОЛИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕКОНДЕНСАЦИИ ЯДЕРНОГО ХРОМАТИНА В ЗРЕЛЫХ СПЕРМАТОЗОИДАХ МЫШЕЙ-ГИБРИДОВ СВА/C57BL6 И МЫШЕЙ ЛИНИИ 129/IMG, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЙОТА

С.Т. Захидов¹, В.М. Рудой², О.В. Дементьева², Н.М. Муджири¹, С.М. Павлюченкова¹, И.В. Макарова³, И.А. Зеленина¹, Т.Л. Маршак⁴, Л.Е. Андреева³

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия, ³Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия, ⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

С помощью метода деконденсации хроматина *in vitro* изучены последствия действия ультрамалых наночастиц Au на нативные зрелые сперматозоиды мышей-гибридов СВА/C57BL6 и мышей линии 129/IMG, мутантных по гену ДНК-полимеразы йота. Гаметы, выделенные из эпидидимисов мышей обеих линий, инкубировали в физиологическом растворе (контроль) и в гидрозоле наночастиц золота (опыт) при 23, 37 и 60°C в течение 30 мин. Затем контрольные и опытные образцы обрабатывали в растворе, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН) и тиоловый деконденсирующий агент дитиотреитол (ДТТ).

Подсчеты показали, что после инкубации спермиев мышей-гибридов СВА/C57BL6 в физиологическом растворе (контроль) при температурах 23, 37, 60° выход ядер с недеконденсированным, частично и полностью деконденсированным хроматином был практически одинаковым – 2:9:89%, 2:8:90% и 0:5:95%. При тех же температурных условиях инкубации, «озолоченные» сперматозоиды проявили высокую устойчивость к действию ДТТ: число недеконденсированных, частично и полностью деконденсированных ядер соотносилось как 30:33:37%, 30:40:30% и 78:22:0%. Что касается популяции спермиев мышей линии 129/IMG, то в контроле, после инкубации клеток в физиологическом растворе при 23, 37, 60° процентное соотношение недеконденсированных, частично и полностью деконденсированных ядер составило 0:13:87, 3:12:85 и 20:49:31, тогда как в опыте, соответственно, 8:27:65, 3:45:52 и 31:66:3.

Сопоставление полученных результатов показывает, что в контроле ответ нативных эпидидимальных сперматозоидов мышей-гибридов СВА/C57BL6 и мутантных мышей линии 129/IMG на действие ДТТ отличается только при 60°, в то время как после обработки наночастицами золота различия есть при всех использованных температурах инкубации. Наши опыты с ультрамалыми наночастицами золота указывают на потенциальную возможность существования каких-то тонких различий в упаковке ДНП-комплекса в зрелых гаметах самцов мышей-гибридов СВА/C57BL6 и мутантных мышей линии 129/IMG.

В работе обсуждаются возможные физико-химические механизмы действия наночастиц золота на зрелые сперматозоиды млекопитающих.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

S06-14**ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ УЛЬТРАМАЛОГО РАЗМЕРА НА ОБРАТНЫЙ ТРАНСПОРТ ХОЛЕСТЕРИНА****Кудинов В.А., Кострюкова Л.В., Касаткина Е.О., Ипатова О.М., Арчаков А.И.****Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича**

Атеросклероз занимает ведущее место в структуре смертности среди населения во всем мире. При этом основным фактором риска атеросклероза сосудов признан высокий уровень холестерина в крови. В связи с этим одним из подходов профилактики и терапии атеросклероза является коррекция уровня холестерина (ХС) плазмы. Среди лекарственных препаратов для снижения уровня ХС наиболее распространены ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы – ключевого фермента в последовательности реакций синтеза ХС. Однако показано, что терапия статинами снижает риск возникновения КБС лишь на 20-35%. При этом регрессия атеросклеротических поражений сосудов не наблюдалась. В настоящее время большое внимание уделяется процессам, ответственным за выведение ХС из организма – т.н. «обратному» транспорту ХС (ОТХС). Основным звеном ОТХС являются липопротеины высокой плотности (ЛВП). Эффективность ОТХС определяется не только уровнем, но и составом ЛВП, в частности содержанием в них фосфатидилхолина (ФХ). Это *in vitro* подтверждается повышением акцепции ХС из макрофагов при насыщении ЛВП ФХ-ом, а также эффективностью терапии атеросклероза с использованием препаратов на основе полиненасыщенного фосфатидилхолина.

В настоящее время схемы лечения атеросклероза практически не включают пероральное введение препаратов на основе ФХ из-за отсутствия лекарственной формы, обеспечивающей эффективную активацию ОТХС. В ИБМХ на основе оригинальной фосфолипидной композиции разработан лекарственный препарат Фосфолипovit, который в водной среде представляет собой наноземulsion с размером частиц 20-25 нм. *In vitro* наблюдается обратная корреляция насыщения ЛВП ФХ-ом с размером частиц эмульсии. *In vivo* показано, что в сравнении с капсульной формой препарата Эссенциале всасывание ФЛ в виде наночастиц увеличивается почти в 2 раза. Повышение кишечной абсорбции ФХ должно способствовать обогащению ими ЛВП, а, следовательно, усилению ОТХС. В настоящее время проводятся клинические исследования безопасности и переносимости препарата Фосфолипovit здоровыми добровольцами.

S06-15**ХАРАКТЕРИСТИКА ВЯЗКОУПРУГИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ МЕТОДОМ АСМ В ЖИДКОСТИ**

Бондарь О.В., Лебедев Д.В., Шевченко В.Д., Осин Ю.Н., Штырлин Ю.Г., Абдуллин Т.И.
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Для изучения влияния амфифильных полимеров на микромеханические свойства клеточных мембран применена атомно-силовая микроскопия (АСМ) в жидкости. С помощью острого кантилевера (диаметр зонда порядка 10 нм) получены изображения топографии поверхности первичных фибробластов кожи человека. Однако сканирование поверхности опухолевых клеток аналогичным способом затруднено в связи с их меньшей упругостью и адгезией к субстрату. Для устранения этих недостатков нами были изготовлены специальные зонды с закрепленной кварцевой микросферой на вершине кантилевера. Анализируя силовые кривые в ходе продавливания клеток зондом, получены значения модуля Юнга (простого и комплексного), вязкости и времени релаксации плазмалеммы.

С помощью предложенного подхода мы проанализировали изменения вязкоупругих свойств плазмалеммы клеток РС-3 при взаимодействии с линейным блоксополимером этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО) L61, композиция которого с противоопухолевым препаратом в настоящее время проходит клинические испытания, а также с новым трех функциональным блоксополимером ЭО и ПО марки Лапрол. Показано, что исследуемые полимеры уменьшают модуль Юнга и вязкость плазмалеммы, что может способствовать внутриклеточной доставке лекарственных средств.

S06-16**ВЛИЯНИЕ НАНОДИСПЕРСНОЙ ФОРМЫ ГЛЮКОНАТА КАЛЬЦИЯ НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИРОВАННЫМ УГЛЕВОДОРОДОМ****И.А. Меньшикова, Э.Р. Бикметова, Ф.Х. Камилов****ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, г. Уфа**

Цель работы - оценить эффективность применения нанодисперсной аморфной формы глюконата кальция (кальций-Маг) на метаболизм костной ткани экспериментальных животных при хронической интоксикации дихлорэтаном.

Эксперименты проведены на 80 половозрелых белых крысах, которым ежедневно в течение двух месяцев вводили внутрижелудочно ДХЭ, в суммарной дозе 0,1 ЛД₅₀ (50 мг/кг). Животные были разделены на 2 группы: 1-ю (контрольную) группу составили 20 крыс, которые на протяжении двух месяцев ежедневно получали оливковое масло, крысы 2 группы на фоне интоксикации ДХЭ получали ежедневно внутрижелудочно в течение последнего месяца эксперимента кальций-МАГ, который вводили в виде суспензии из расчета 253 мг/кг массы тела.

У животных в плазме крови определяли содержание общего и ионизированного кальция, фосфора, С-концевых телопептидов коллагена типа I, активность общей и костной щелочной фосфатазы, уровни тестостерона, эстрадиола, кортизола, паратгормона. В гомогенате эпифиза трубчатых костей определяли содержание белковосвязанного и свободного оксипролина.

Полученные результаты позволили установить, что интоксикация дихлорэтаном оказывает системное воздействие на органы и ткани, включая эндокринные железы, результат, которого - развитие гормонального дисбаланса, негативно влияющего на ремоделирование костной ткани, с превалированием процессов резорбции. Введение подопытным животным препарата кальций-МАГ способствует нормализации показателей кальциевого обмена, снижению деструкции костной ткани, восстановлению баланса костной резорбции и остеогенеза.

S06-17

MONITORING DYNAMICS OF BIOMOLECULES, DRUG CARRIERS, AND LIVING CELLS BY ORGANIC ELECTROCHEMICAL TRANSISTORS (OECT) TOWARDS INNOVATIVE BIOELECTRONICS

S. Iannotta

Institute of Materials for Electronics and Magnetism (IMEM), National Research Council (CNR), Parma, Italy.

Organic Electrochemical Transistors (OECTs) are emerging as devices ideally suitable for biomedical sensing and bio-electronics[1]. We here show OECTs operating in bio-liquid environments sensing and monitoring biomolecules at high sensitivity. The devices, based on the conductive polymer PEDOT:PSS, operating at low-voltages in liquids, confirm to be an ideal interface between electronics and biology[2].

In particular we will discuss our recent achievements in biosensing relevant for nanomedicine and drug delivery applications: detection and monitoring of drug-loaded liposomes and liposome-based nanoparticles [3] real time studies and analysis of redox properties of phase-responsive pigment biopolymers[4]. Finally we achieved the ability to directly study drug stress and death on cells cultivated on a Transwell membrane, directly integrated in the OECT. We will show the first observation of cellular death, induced by drugs and other chemical substances on normal and cancer cells, achieved by monitored the device output current that is sensitive to the cells death. These studies pave the way to OECTs as low cost and disposable devices for the monitoring drugs action dynamics.

[1] Coppedè, G Tarabella, M Villani, D Calestani, A Zappettini, S Iannotta, Human stress monitoring through an organic cotton-fiber biosensor, *J. Mater. Chem. B* 2 (34), (2014), 5620-5626; F. Gentile, N. Coppedè, G.Tarabella, M.Villani, D. Calestani, P. Candeloro, E. Di Fabrizio, S. Iannotta, Microtexturing of the Conductive PEDOT:PSS polymer for Super-hydrophobic Organic Electrochemical Transistors, *BioMed research international* 2014 (in press)

[2] G. Tarabella, F. MahvashMohammadi, N. Coppedè, F. Barbero, S. Iannotta, C. Santato and F. Cicoira, "New opportunities for organic electronics and bioelectronics: ions in action", *Chemical Science*, 2013, 4, 1395-1409.

[3] G. Tarabella et al., "Liposomes Sensing and Monitoring by Organic Electrochemical Transistors Integrated in Microfluidics", *Biochem. Biophys. Acta*, 2013, 1830, 9, 4374-4380.

[4] G. Tarabella, A. Pezzella, A. Romeo, N. Coppedè, P. D'Angelo, M. Calicchio, M. d'Ischia, R. Mosca and S. Iannotta, "Irreversible Evolution of Eumelanin Redox States Detected by an Organic Electrochemical Transistor: En Route to Bioelectronics and Biosensing", *J. Mater. Chem. B*, 2013,1, 3843-3849.

S06-18

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ДОМЕНА III БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ.

¹Ершова А.С., ¹Гра О.А., ¹Лящук А.М., ¹Грунина Т.М., ¹Громов А.В., ¹Бартов М.С., ¹Савина Д.М., ¹Манухина М.С., ¹Семихин А.С., ¹Галушкина З.М., ²Козловская Л.И., ²И.С.Холодилов, ²Карганова Г.Г., ¹Лунин В.Г., ¹Карягина А.С.

¹ФБГУ “Научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Министерства здравоохранения Российской Федерации; ²ФГБУ “Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова”

Существующие вакцины против вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) доказали свою эффективность. Тем не менее, необходимость ревакцинаций, возможность аллергических реакций, высокая стоимость, регистрация случаев заболевания среди вакцинированных вызывают необходимость разработки более безопасной и эффективной вакцины.

Мы изучили иммуногенность препарата, содержащего домен III белка Е оболочки ВКЭ как антиген. В качестве адьюванта был использован декстран и синтетические CpG олигонуклеотиды.

Для оценки вариабельности домена III белка Е были проанализированы 386 доступных последовательностей, полученных через БД GenBank. Результаты подтвердили, что домен III белка Е имеет три позиции (313, 317 и 331), аминокислотные остатки в которых различаются для генетических типов ВКЭ (Сибирского, Европейского и Дальневосточного). Поэтому в состав препарата были включены три основных варианта последовательности домена III.

Плазмидные конструкции, содержащие последовательность домена III белка Е трех генетических типов, были получены и экспрессированы в *E.coli*. Антигенная структура очищенных белков подтверждена с помощью ИФА с использованием моноклональных антител к белку Е (“ВекторВКЭ-Антиген”) и сывороток больных КЭ.

В сыворотках мышей, иммунизированных препаратом на основе генно-инженерного белка, методом ИФА обнаружены антитела к штамму Софьин в концентрации 47600 ед./мл – на второй, 239000 ед./мл – на третьей, и 1635000 ед./мл на четвертой неделе после иммунизации.

Реакция нейтрализации бляшек вируса в культуре клеток СПЭВ для препарата на основе III домена генно-инженерного белка Е показала пониженные относительно вакцины сравнения “Клещ-Э-Вак” титры антител ко всем трём использованным штаммам ВКЭ (Васильченко, Софьин, Абсеттаров) на 2, 3 и 4 неделе после иммунизации.

Показано, что генно-инженерный домен III белка Е оболочки ВКЭ имеет антигенную структуру, соответствующую нативному белку. Препарат индуцирует синтез противовирусных нейтрализующих антител, специфичных в отношении определенных штаммов ВКЭ. Дальнейшая работа будет направлена на повышение иммуногенности препарата.

Работа поддержана грантом Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-2038.2014.7.

S07-01

DIAGNOSIS OF ORPHAN DISEASE

E.N. Suspitsin^{1,2}

¹*N.N.Petrov Institute of Oncology, St.-Petersburg;* ²*St.-Petersburg State Pediatric Medical University*

Rare (orphan) diseases include chronic debilitating conditions characterized by particularly low incidence but altogether affecting around 6-8% of European population. Significant portion of patients with rare diseases fail to obtain correct diagnosis and appropriate treatment within years; this is commonly attributed to the lack of relevant knowledge and experience of practicing physicians. Approximately 80% or rare diseases have genetic origin. Diagnostics of orphan conditions is compromised by their genetic heterogeneity: indeed, every ethnic group has own “gene pool” brought by “ancestors of the nation” and therefore unique spectrum of pathogenic mutations. Proper diagnosis of orphan maladies is important for guiding the treatment as well as for further family planning. It also provides better opportunities for social and psychological rehabilitation of the affected subjects, such as visiting targeted learning courses, access to specific patient communities, participation in internet-based networks, etc.

Some targeted therapies for orphan diseases have recently become available, e.g. ivacaftor in cystic fibrosis, enzyme replacement therapy for lysosome storage diseases, vandetanib for medullary thyroid cancer etc. Recent studies have demonstrated encouraging results of the use of mTOR inhibitors in patients with tuberous sclerosis (TS). We are aiming to create a registry of TS patients. So far, we managed to identify 38 subjects with clinical manifestation of TS. Appropriate DNA analysis confirmed the presence of mutations in 28 (74%) cases (TSC1: 8; TSC2: 20). We consider exome sequencing for TSC1/2 mutation-negative cases for identification of novel TS genes.

Use of exome sequencing in previously unstudied populations may have significant implications. We have recently identified a multi-case family with Bardet-Biedl syndrome (BBS), which is a rare autosomal recessive ciliopathy manifesting with obesity, postaxial polydactyly, retinal degeneration, mental retardation and renal abnormalities. High genetic heterogeneity significantly compromises DNA testing for BBS patients. We opted for the use of exome analysis, and revealed L656fsX673 mutation in BBS7 gene both in parents and in affected children; BBS7 is not included in standard diagnostic BBS panels, however our extended epidemiological study has demonstrated its non-random occurrence and therefore high relevance for Russian population.

S07-02

СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ РОЛИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ КРОНА

**Тяхт А.В., Манолов А.С., Каныгина А.В., Коварский Б.А., Ракитина Д.А., Кострюкова Е.С., Алексеев Д.Г., Говорун В.М.
 НИИ ФХМ, Москва, Россия**

Метагеномный анализ микробиоты кишечника человека в норме и при заболеваниях показывает, что повышенная представленность бактерий семейства Enterobacteriaceae – один из признаков дисбаланса микробиоты. Так, болезнь Крона (БК), этиология которой до конца не прояснена, ассоциирована с ростом доли бактерии *Escherichia coli* в микробиоте. Несмотря на множество исследований роли данной бактерии, ряд вопросов до сих пор остаются без ответа. Является ли *E. coli* одной из причин БК или же ее повышенная представленность – лишь следствие заболевания? Существует ли БК-ассоциированная группа *E. coli* как один или несколько специфических филотипов, и, если да, то в чем их характерное отличие от того же вида, присутствующего в микробиоте как у здоровых людей, так и при других заболеваниях? На каком уровне выделяема эта сигнатура – на уровне отдельных генов, семейств генов, функций, набора функций? Гетерогенна ли Крон-ассоциированная кишечная палочка – как в пределах ЖКТ одного пациента, так и между пациентами? Чтобы ответить на эти вопросы, мы провели shotgun метагеномный анализ микробиоты у пациентов с БК совместно с геномным анализом изолированных от них штаммов *E. coli*. Для количественного профилирования генового состава *E. coli* в метагеноме нами был использован набор генов, названный нами потенциально патогенными генами (POG), который был получен путем вычитания инвариантного множества генов (core-генома) из пангенома для известных геномов 34 патогенных и комменсальных штаммов *E. coli*. Относительная представленность генов POG была использована для сравнения новых метагеномов пациентов с БК с более чем 400 метагеномами населения стран мира – как здоровыми, так и с БК. Статистический анализ показал, что *E. coli* от пациентов с БК образуют несколько компактных кластеров среди общей выборки, при этом метагеномы из разных отделов кишечника от одного и того же пациента имеют высокое сходство. Эти результаты были подтверждены на уровне сходства однонуклеотидных полиморфизмов между *E. coli* из разных метагеномов. Результаты геномного сравнения изолятов, полученных от разных пациентов, оказались согласованными с метагеномными данными. Обобщение на уровне функций генов, различающих микробиоту здоровых людей и пациентов, позволяет приблизиться к пониманию роли *E. coli* в патогенезе БК.

S07-03

АНАЛИЗ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ GRM3 И GAD2 С РАЗВИТИЕМ ШИЗОФРЕНИИ У РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Киняшева Карина Олеговна, Гареева Анна Эмировна, Хуснутдинова Эльза Камилевна
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, Республика Башкортостан

Шизофрения - это тяжелое многофакторное психическое заболевание с высоким коэффициентом наследования (ок. 80%) и приблизительно одинаковой распространенностью во всем мире (ок. 1% населения). Нарушение функционирования глутаматергической системы, а также дефицит ингибирования, связанный с нарушением работы ГАМК-ергической нейротрансмиттерной системы, считаются одними из важнейших компонентов этиопатогенеза шизофрении. Из литературных данных известны ассоциации полиморфных вариантов гена метаболитного рецептора глутамата третьего типа GRM3 (7q21.1 - q21.2) и гена ГАМК-декарбоксилазы GAD2 (10p11.23) с развитием шизофрении.

Цель данного исследования - изучение роли трех полиморфных локусов rs274622, rs187993, rs6465084 гена GRM3 и двух полиморфных локусов rs2236418, rs928197 гена GAD2 в развитии шизофрении в этнических группах русских и татар из Республики Башкортостан. Выборка состояла из 338 больных (50% русских и 50% татар) и 350 здоровых индивидов (50% русских и 50% татар).

В результате проведенного исследования выявлены маркеры повышенного риска развития шизофрении – это генотипы $GRM3 * G / * G$ (OR = 2,16; P = 0,043) локуса rs187993 гена GRM3 в русской этнической группе и $GRM3 * A / * A$ (OR = 3,69; P = 0,00003) и аллель $GRM3 * A$ (OR = 2,55; P = 0,0003) полиморфного локуса rs6465084 гена GRM3 у лиц татарской этнической принадлежности. Анализ неравновесия по сцеплению показал наличие умеренного сцепления между двумя локусами rs274622 и rs187993 гена GRM3 ($D' = 0,51$) в русской этнической группе. При анализе распределения частот гаплотипов между изученными группами лиц с шизофренией и контролем достоверные различия не выявлены.

При изучении полиморфных локусов гена GAD2 обнаружено, что генотип $GAD2 * A / * A$ (OR=3,62; P=0,0009) и аллель $GAD2 * A$ (OR=3,11; P=0,002) локуса rs2236418 являются рисковыми маркерами развития шизофрении у лиц татарской этнической группы. При анализе распределения частот гаплотипов, сконструированных на основе rs2236418, rs928197 гена GAD2, выявлен гаплотип AT, являющийся маркером повышенного риска развития шизофрении (OR=2,15; P=0,0001) у лиц татарской этнической принадлежности.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-97012p_поволжье_a).

S07-04**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОНКОГЕННЫХ И ОНКОСУПРЕССОРНЫХ МИКРОРНК И ИХ КЛАСТЕРОВ ПРИ РАЗВИТИИ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Матишов Дмитрий Геннадьевич¹, Тарасов Валентин Алексеевич¹, Бойко Николай Валерьевич¹, Шин Евгения Федоровна¹, Тимошкина Наталья Николаевна¹, Махоткин Михаил Александрович¹, Ломоносов Андрей Михайлович², Кирпий Александр Александрович²

¹*Институт аридных зон Южного научного центра РАН, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация*, ²*ООО "Интерлабсервис", г. Москва, Российская Федерация*

С помощью метода параллельного множественного секвенирования был проведен анализ экспрессии микроРНК в 5 образцах рака толстой кишки и в 5 образцах нормальной ткани толстой кишки тех же пациентов. Идентифицированы 15 микроРНК, которые показали aberrantное изменение экспрессии во всех 5 случаях рака, при этом 7 из них показали увеличение экспрессии, а 8 – снижение. Кроме того, 8 и 17 микроРНК продемонстрировали увеличенную и уменьшенную экспрессию в четырех опухолях, соответственно.

МикроРНК, показавшие в нашем исследовании aberrantную экспрессию в опухолях, представлены в геноме 16 кластерами. При этом 6 из этих кластеров продемонстрировали однонаправленное изменение экспрессии всех микроРНК, входящих в кластер. Для 10 оставшихся кластеров изменение экспрессии было разнонаправленное, что, по-видимому, связано с нарушениями процессов созревания микроРНК, входящих в кластеры такого рода.

В результате проведенного исследования нами идентифицированы как микроРНК, для которых ранее уже была показана связь с развитием рака толстой кишки, или участие в контроле экспрессии генов, вовлеченных в развитие данного типа рака, так и микроРНК (miR-100-5p, miR-30d-5p, miR-204-5p), для которых такие данные отсутствуют.

S07-05

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ FISH И ОНКОМАРКЕРА AURKA ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КАНЦЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ: АЛЬТЕРНАТИВНАЯ МОДЕЛЬ IN VITRO.

Колесникова Ирина Станиславовна

ФГУП "НИИ Гигиены, Профпатологии и Экологии Человека" ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ген AURKA, расположенный в локусе 20q13, кодирует Аурога-киназу, необходимую для правильной сегрегации хромосом в митозе. Показано, что амплификация данного гена и/или его сверхэкспрессия наблюдается в клетках многих злокачественных опухолей (колоректальном раке, раке мочевого пузыря, мозговых опухолях, раке груди, яичников, и т.д.), лейкомих, а также обнаружена ассоциация возрастания копияности этого гена со степенью злокачественности опухоли. Поэтому данный ген активно предлагается в качестве диагностического и прогностического маркера онкологических заболеваний. Нами он был использован в качестве маркера в альтернативной модели оценки канцерогенного потенциала веществ на культуре лимфоцитов периферической крови человека. Было поставлено 3 эксперимента с использованием NiCl_2 (известный мутаген и канцероген) в конечной концентрации 50 мкг/мл и 2 - наночастиц SiO_2 в конечных концентрациях 100 и 200 мкг/мл. Тестируемые вещества добавляли в самом начале культивирования, длительность которого составляла 96 ч. С помощью FISH с зондом, специфичным к локусу 20q13, анализировали: 1) количество копий гена AURKA; 2) синхронность репликации гомологичных локусов (нарушается при генетическом дисбалансе, в том числе в раковых клетках). Во всех экспериментах как с NiCl_2 , так и с SiO_2 была обнаружена десинхронизация репликации гомологичных локусов 20q13, что косвенно указывало на их вероятное мутагенное действие. В 2х экспериментах из 3х при воздействии NiCl_2 и в 1 эксперименте из 2х при воздействии SiO_2 в обеих концентрациях было обнаружено достоверное повышение количества клеток с увеличенным числом копий гена AURKA. В 3м эксперименте с NiCl_2 и во втором эксперименте с SiO_2 достоверных различий между опытом и контролем выявлено не было (однако для NiCl_2 наблюдалась тенденция, $r=0,14$) при высоком базовом уровне показателя у донора. Полученные результаты согласуются с многочисленными данными о канцерогенности NiCl_2 . Результаты для наночастиц SiO_2 также указывают на их заметное влияние на лимфоциты человека, однако, чтобы говорить об их канцерогенном эффекте, необходимы дополнительные исследования. Тем не менее, результаты пилотных экспериментов говорят о том, что выбранный подход может быть информативен для анализа потенциальных канцерогенных свойств веществ.

S07-06

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОСВЯЗИ В-ГЛОБУЛИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ И МАРКЕРНЫХ БЕЛКОВ ОПУХОЛЕЙ ПОЧЕК И МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Ерлыкина Е.И.², Обухова Л.М.², Языкова А.Б.², Россохин В.Ф.²,
 Горшкова Т.Н.¹

¹ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России,

²ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Нижний Новгород, Россия,

Целью работы стал анализ изменения белковых фракций плазмы крови при онкологических заболеваниях и выявление молекулярной взаимосвязи между ними и тканевыми маркерами при раке почки и мочевого пузыря.

Исследовалась плазма крови 87 онкологических больных, ранее не подвергавшихся противоопухолевому лечению, 9 пациентов с псориазом. Контролем служила плазма крови 52 здоровых человек. Биохимические параметры оценивали на анализаторе "КонеЛаб 20/20i" (Финляндия). Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0.

У больных злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей снижен уровень альбуминов ($p=0,020$) и β -глобулинов ($p=0,025$), повышен уровень $\alpha 1$ -глобулинов ($p=0,021$) и γ -глобулинов ($p=0,001$). При проведении сравнения групп больных с разной локализацией опухолей методом дисперсионного анализа значимых отличий по содержанию белковых фракций выявлено не было. Наиболее выражено различие в их концентрации при онкологических заболеваниях и псориазе для β -глобулинов, в связи с чем был проведен анализ взаимосвязи индивидуальных белков этой фракции с тканевыми маркерами рака почки и мочевого пузыря (YWHAG, DNM2, GLUD1, CYFIP2, PLGRKT), выявленными по базам данных белок-белковых взаимодействий (IntAct, STRING, BioGrid, SwissProt). Показано взаимодействие трансферрина с DNM2- ГТФ-связывающим белком, ассоциированным с микротрубочками, участвующим в изменениях мембран и связанным с различными сигнальными путями. Трансферрин участвует в белок-белковых взаимодействиях с YWHAG, опосредующей сигнальную трансдукцию при связывании с фосфосеринсодержащими белками. Помимо роли ангиостатина как ингибитора ангиогенеза, он за счет взаимодействия с CYFIP2, вовлечен в p53/TP53-зависимую индукцию апоптоза и Т-клеточную адгезию. Наибольшее количество белок-белковых взаимодействий было выявлено для белков фракции β -глобулинов, содержание которых снижается в плазме крови при злокачественных новообразованиях: трансферрин – 11 белков-интеракторов, ангиостатин – 4. Таким образом, изменение содержания β -глобулинов плазмы крови при злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей, в том числе рака почки и мочевого пузыря, может рассматриваться как специфический патогенетический критерий и служить в качестве дополнительного диагностического признака.

S07-07

THE MNSOD ALA16VAL SNP RELEVANCE IN GROUP A STREPTOCOCCUS INFECTIONS

Emene Chuka Charles¹, Prof. Albert Anatolevich¹, Dr. Irina Kravchenko²

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.,*

²*Faculty of Infectious diseases, Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

One of the most commonly studied antioxidant enzyme is manganese superoxide dismutase (MnSOD). MnSOD is a metalloprotein which converts superoxide anions to molecular oxygen and hydrogen peroxide. It acts as a major defense enzyme against ROS within the mitochondria, which is considered the main ROS production locus in aerobes. A single nucleotide polymorphism (snp) within exon 2 of MnSOD gene (rs4880) involving a substitution of thiamine (T) for a cytosine (C) results in the production of a β -sheet secondary structure instead of the expected α -helix structure, which may decrease the transport efficiency of the enzyme into the mitochondria by 30 to 40 %.

Group A streptococcus (GAS) is a catalase-negative Gram-positive bacterium often found in the throat and on the skin of human but can be internalized by human cells efficiently exposing this pathogen to exogenously generated products. The GAS genome only encodes SodA enzyme involved in protection of bacteria in aerobic environments which may not be enough for its protection against ROS and products of antioxidants.

This aim of this study was to identify a possible effect of MnSOD Ala16Val snp to the prevalence of group A streptococcus infections.

Case study was 64 patients with persistent erysipelas and angina infections.

After clinical condition collection and diagnosis confirmation, and followed by DNA extraction, DNA was analyzed for the C to T point mutation.

Chi square value of 19.909 with P value is less than 0.0001 and 2 degrees of freedom was a result of comparing our results against HapMap rs4880 polymorphism for Europeans (ss71640628). By conventional criteria, this difference is considered to be extremely statistically significant indicating that prevalence of GAS is dependent on MnSOD.

S07-08

ВЛИЯНИЕ СЕРТОНИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНА C-FOS В НОРМЕ И ПРИ ЭНДОТОКСИКОЗЕ

Трофимов Владимир Александрович, Лопухова Евгения Николаевна

ФГБОУ ВПО "Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва". Саранск, Россия

Вновь активировавшийся интерес к изучению генов раннего ответа и их роли в развитии различных заболеваний не обошел и ген *c-fos*, являющийся одним из компонентов транскрипционного фактора AP-1. Показано, что изменение экспрессии *c-fos* может быть связано с атеросклерозом, воспалением дыхательных путей, ишемической болезнью сердца. В настоящей работе представлены изменения экспрессивной активности гена *c-fos* в моноцитах доноров и больных с эндотоксикозом, при стимуляции клеток *in vitro* серонином.

Работу проводили на образцах РНК, выделенных из моноцитов доноров и больных с острым аппендицитом, осложненным перитонитом, у которых зарегистрированы явления эндогенной интоксикации различной степени тяжести (больные с эндотоксикозом). Рабочая концентрация суспензии моноцитов составляла 10^6 кл/мл. В культуральную среду добавляли серотонин («Sigma», США) до концентрации 0,1 и 1 мМ. Пробы инкубировали в CO_2 -инкубаторе при температуре 37°C в течение 10 и 30 минут.

Анализ экспрессивной активности проводили методом ОТ-ПЦР с помощью наборов фирмы «Синтол» (Россия). Для амплификации кДНК *c-fos* использовали праймеры: F 5'-GGAGGACCTTATCTGTGCGTGA -3', R 5'-GAACACACTATTGCCAGGAACACA -3'. Внутренний контроль проводили с использованием ПЦР реакции на ген *AKTБ*.

Анализ клеток крови на экспрессивную активность гена показал, что в моноцитах больных с эндотоксикозом отмечается тенденция к повышению уровня экспрессии гена, зависящая от тяжести заболевания.

При действии серотонина в опытах *in vitro* обнаружено поступательное увеличение количества мРНК гена *c-fos* в обеих группах. При этом более выраженный ответ наблюдался в группе доноров при воздействии серотонина в концентрации 0,1 мМ. Максимального уровня в группе больных с эндотоксикозом количество мРНК гена *c-fos* достигало при 30 минутной инкубации с 1 мМ серотонина.

Серотонин является одним из медиаторов межклеточных взаимодействий и при воспалении количество серотонина резко возрастает, что может приводить к микроциркуляторным нарушениям и повышению проницаемости сосудов. Обнаруженный нами специфический эффект стимуляции серонином экспрессии гена *c-fos* в моноцитах в норме и при эндотоксикозе позволяет глубже понять механизм хронизации воспаления и роль в этом процессе генов раннего ответа.

S07-09

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ LIG3 ИХРА У РАБОТНИКОВ УРАНОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В КАЧЕСТВЕ ОЦЕНКИ НАГРУЗКИ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ.

Айнур Акильжанова¹, Казымбет Полат Казымбетович², Бахтин Мейрат Мухамедкаримович², Жабагин Максат¹, Алия Абилямажинова¹

¹"Центр Наук о Жизни", Назарбаев Университет. Астана, Казахстан., ²Институт радиобиологических исследований, Медицинский Университет Астаны, Астана, Казахстан

Принимая во внимание тот факт, что Казахстан является одним из мировых лидеров по добыче урана, а также учитывая масштабы ущерба, причиненного в результате работы Семипалатинского испытательного ядерного полигона, общий фоновый фон некоторых регионов оказался под влиянием дополнительного воздействия хронического облучения малыми дозами радиации. Целью нашего исследования являлось определение влияния ионизирующего излучения на экспрессию генов у работников урановой промышленности города Степногорск, подвергающихся хроническому облучению. По литературным данным известно, что экспрессия генов LIG3 и XPA, участвующих в регуляции репарации ДНК, может выступать в качестве чувствительных биологических маркеров дозиметрии ионизирующих излучений.

В исследование были приглашены работники урановой промышленности группы А (N=20), подвергающиеся излучению не более 50 мЗв в год, и группы Б (N=19), подвергающиеся излучению не более 20 мЗв в год. Все участники дали информированное согласие на участие. Произведен забор венозной крови в специальные пробирки TempusBloodRNA. РНК была выделена из цельной крови и конвертирована в кДНК по протоколу StabilizedBlood-to-CT™ NucleicAcidPreparationKit (Lifetechnologies). Определение экспрессии образцов проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени на амплификаторе 7900HT (AppliedBiosystems) с набором TaqMan зондов. В качестве эндогенного контроля был использован ген B-actin.

Данные экспрессии генов LIG3 и XPA были проанализированы и в сравнены между группами А и Б в программном обеспечении SDSRQmanager. Анализ экспрессии данных генов показал значимую разницу в экспрессии генов между двумя группами. Повышение экспрессии генов LIG3 и XPA наблюдалось в группе с повышенной дозой облучения. Экспрессия гена LIG3 в группе А была в 5.96 раз больше чем в группе Б. Экспрессия гена XPA в группе А была в 7.65 раз больше чем в группе Б. Наблюдаемые изменения профиля экспрессии таких генов можно использовать в качестве биомаркера дозиметрии в урановой промышленности для оценки нагрузки облучения промышленных работников.

S07-10**КАРИОТИП, КАК ТЕСТ - СИСТЕМА В ЦЕЛЯХ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОМЕТРИОЗА.**

**М.А.Шилина¹, В.И.Земелько¹, И.В. Кожухарова¹, А.П.Домнина¹, А.А.Кирсанов²,
Н.Н.Никольский¹, Т.М.Гринчук¹**

**¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, ²Международный Центр
Репродуктивной Медицины. Санкт-Петербург, Россия**

Целью настоящей работы было сравнить степень генетической стабильности кариотипа эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (ЭМСК) *in vitro* от пациента с аденомиозом (форма эндометриоза, вар-т 1), от 2-х здоровых доноров, полученные из десквамированного эндометрия менструальной крови (вар-т 2, 3) и клеточной культуры фибробластов эмбрионального легкого человека (вар-т 4). Варианты 1 и 2 были проанализированы на ранних пассажах (пас. 7 и 3, соответственно), вариант 3 на ранних – 3, 6-ом и продвинутом 15-ом пассаже, вариант 4 на 18-ом пассаже. Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (вар-та 1, 2, 3) на момент анализа сохраняли свой мультипотентный статус.

Анализ метафазных хромосом всех четырех линий методом G-бэндинга показал, что каждая культура имела пул клеток с отклонениями от нормального кариотипа - изменение копийности той или иной хромосомы (вар-ты 1,2,3,4), наличие хромосомных поломок (вар-ты 1,2,3,4), возникновение межхромосомных конъюгаций, как эктопических, так и транслокаций (вар-ты 2,3,4). В большинстве клеток возникшие изменения носили случайный характер, хотя в некоторых из них наблюдались все три типа отклонений.

Наименьшее количество «дефектных» клеток наблюдалось в линиях ЭМСК, полученных от здоровых доноров (вар-тах 2 и 3). В эмбриональных фибробластах легкого (вариант 4), использованных в качестве контроля, несмотря на то, что изменения носили случайный характер, количественно и качественно их было больше, чем при длительном культивировании в ЭМСК(вар-т 3), что объяснимо более активным использованием данной культуры в работе.

На этом фоне, порядок кариотипических изменений от донора с аденомиозом был несколько иным. Выявленные отклонения от нормы позволили говорить о преимущественном вовлечении в перестройки конкретных хромосом набора, а именно хромосом 7 и 11, которые вовлекались в поломки неоднократно. Совпадение полученных данных слитературными позволило говорить о том, что повышенная ломкость хромосом 7 и 11 может быть маркером в диагностике заболевания связанного с эндометриозом, в данном случае - аденомиозом.

S07-11

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ *M. TUBERCULOSIS* С ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ В ЮЖНЫХ РЕГИОНАХ КАЗАХСТАНА

Д.Р. Райымбек¹, П.В. Тарлыков¹, А.Х. Аленова², Т.Ш. Абилдаев², В.Л. Бисмилда², Е.М. Раманкулов¹

¹Национальный центр биотехнологии, г. Астана, Казахстан, ²Национальный центр проблем туберкулеза, г. Алматы, Казахстан

По данным ВОЗ на 2013 год, Казахстан занимает одно из ведущих мест в мире по проценту заболеваемости резистентными формами туберкулеза.

Целью данного исследования было охарактеризовать изоляты *M. tuberculosis* с ШЛУ ТБ, циркулирующие на юге Казахстана, на основе MIRU-VNTR типирования и обнаружения мутаций в генах резистентности к препаратам первого и второго ряда.

В Национальном центре проблем туберкулеза (г. Алматы) было собрано 34 клинических изолята *M. tuberculosis* с ШЛУ ТБ. Генетический анализ для выявления резистентности штаммов к препаратам первого ряда проводился по генам *rpoB*, *katG* и промоторной области *inhA-fabG* оперона; к препаратам второго ряда – по генам *gyrA*, *gyrB*, и *rrs*. Анализ числа tandemных повторов клинических штаммов проводили на 24 MIRU-VNTR локусах. Построение филогенетического древа осуществлялось при помощи онлайн приложения web-ресурса MIRU-VNTRplus.

По результатам ДНК-секвенирования в гене *katG* была обнаружена мутация в 315 кодоне (89,2%), приводящая к замене серина на треонин. В промоторной области *fabG-inhA* одного изолята была найдена мутация -15 С/Т. Секвенирование *rpoB* гена позволило обнаружить мутации в 531 кодоне с заменой серина на лейцин (78,4%). В результате анализа фрагмента гена *gyrA* у всех 34 изолятов была обнаружена мутация в 95 кодоне, приводящая к замене Ser→Thr. В 94 кодоне была обнаружена замена аспарагиновой кислоты на глицин D94G у 11 образцов (32,4%). Также была выявлена новая мутация – замена аспарагиновой кислоты на цистеин в кодоне 94 (Asp→Cys; 2,9%). У одного образца в гене *gyrB* была обнаружена мутация в 500 кодоне. Секвенирование фрагментов гена *rrs* показало наличие мутации в положении 1401 (A/G; 52,9%). Сравнение MIRU-VNTR-профилей показало, что преобладающая группа ШЛУ изолятов (n=32; 94,1%) принадлежит семейству W-Beijing. Оставшиеся два изолята (5,9%) принадлежали к семейству LAM.

Нами была обнаружена ранее неописанная в литературе замена аспарагиновой кислоты на цистеин в 94 кодоне гена *gyrA*. Также наблюдалось доминирование мутаций в 95 кодоне гена *gyrA*, в 315 кодоне гена *katG* и в 531 кодоне гена *rpoB*. Анализ спектра мутаций подтвердил, что большинство изолятов относятся к ШЛУ ТБ.

S07-12**ETHNICAL DIFFERENCES IN SUSCEPTIBILITY TO THE EFFECTS OF CISPLATIN-BASED CHEMOTHERAPY.****Limborska S.A., Khrunin A.V.*****Institute Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia***

There is substantial interindividual variability in the efficacy and tolerability of anticancer drugs. Such differences can be even greater between individuals of different ethnicities. The clinical studies demonstrate that individuals from Asia (East Asia) are more susceptible to the effects of platinum chemotherapies than their Western counterparts. To determine whether population-related genetic characteristics contribute to differences in patient outcomes, polymorphisms in 106 genes involved mainly in xenobiotic metabolism, DNA repair, the cell cycle, and apoptosis, were evaluated in groups of Russian and Yakut ovarian cancer patients receiving cisplatin-cyclophosphamide chemotherapy. Arrayed primer extension technology was used to genotype 228 single-nucleotide polymorphisms. Totally SNPs in 21 genes were found to be associated with one or more of the assessed clinical end points (tumor response, progression free survival, overall survival and side effects). Comparative analysis of the association spectra did not reveal identical correlations for any of significant SNPs. All associations between SNPs and clinical outcomes were specific for each of ethnic group studied. These findings let us to propose the existence of ethnic related distinctive characteristics in molecular mechanisms determined the sensitivity of patients to platinum drug effects.

S07-13

ПРОТЕОМНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ RD (РАБДОМИОСАРКОМА ЧЕЛОВЕКА), ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКА SFPQ - ПОТЕНЦИАЛЬНОГО БИОМАРКЕРА ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА.

Н.В. Пашинцева, К.В. Лисицкая, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, Л.С. Еремина, А.В. Иванов, С.С. Шишкин

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

В современной протеомике важным направлением работ являются исследования протеомных профилей злокачественных клеток и поиски потенциальных белковых биомаркеров, которые могли бы найти применение в клинической биохимии. В подавляющем большинстве случаев объектами изучения становятся раковые опухоли, и сравнительно мало внимания уделяется саркомам. Так, за последний год в базе данных PubMed по ключевым словам «proteomicscancer» определяется 1256 публикаций, а по словам «proteomicssarcoma» только 26. Вместе с тем, саркомы, в частности, рабдомиосаркомы, представляют серьезную проблему для лиц молодого возраста и даже детей.

Целью данной работы было протеомное изучение белков в клетках линии RD (рабдомиосаркома человека) с масс-спектрометрической идентификацией потенциальных биомаркеров опухолевого роста. Клетки линии RD культивировали в среде DMEM с добавками 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Экстракцию клеточных белков, их фракционирование и анализ двумерных электрофореграмм проводили, как описано ранее. (ShishkinSetal.CancerSci. Ther. 2011. S1). Идентификацию белковых фракций осуществляли методами MALDI-TOFMS и MS/MS на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker). Анализ масс-спектров выполняли с помощью программы Mascot (MatrixScience).

Натипичных двумерных электрофореграммах клеточных белков линии RD при окраске азотнокислым серебром с помощью компьютерного анализа выявлялось 552 фракций, среди которых было идентифицировано 60 белков. Одним из идентифицированных мажорных белков оказался сплайсингфактор, богатый пролином и глутамином (белок SFPQ). Этот белок некоторыми авторами рассматривается как потенциальный биомаркер раковой трансформации. Однако в доступной литературе не оказалось сообщений о присутствии белка SFPQ в клетках рабдомиосарком. Таким образом, полученные в ходе данного исследования убедительные результаты идентификации белка SFPQ (score – 264, coverage - 42) являются, по-видимому, первым свидетельством о его присутствии в клетках рабдомиосаркомы. Соответственно, белок SFPQ может рассматриваться не только как потенциальный биомаркер раковых клеток, но также и клеток рабдомиосарком,

S07-14

МИКРООРГАНИЗМЫ КАК МАРКЕРЫ УТОПЛЕНИЯ

А.А. Тойменцева¹, А.В. Лайков¹, Ю.Д. Романова¹, И.И. Салафутдинов¹, Е.Г. Губеева², В.М. Чернов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, ²ГАУЗ
 «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы Министерства
 здравоохранения Республики Татарстан», Казань, Россия

В практической работе судебно-медицинских экспертов диагностика утопления основывается на четырёх процедурах: патологоанатомическом вскрытии трупа, гистологическом/микроскопическом исследовании, анализе химических маркеров, и планктоноскопическом (диатомовом) анализе. Среди перечисленных методов выявление диатомового планктона долгое время считался "золотым стандартом" в этом вопросе. Однако, данный метод имеет свои недостатки: разнообразие и распространение водорослей имеет сезонные колебания в зависимости от времени года и локальной экосистемы, размер водорослей – 2-200 мкм, что затрудняет их распространение с током крови по организму, способ экстракции и идентификации диатомей является трудоёмким (применение сильнодействующих кислот, многоступенчатое центрифугирование, что приводит к разрушению элементов планктона), более того высока вероятность контаминации трупа водорослями не только во время долгого нахождения в воде, но и воздушным (респираторным) путём и через кишечный тракт. В связи с этим при экспертизе утопления всё большую популярность приобретает метод микробиологического анализа – сравнение бактериальной микрофлоры внутренних тканей организма с бактериальной микрофлорой водоёма, в котором он был обнаружен. Хотя разнообразие микроорганизмов также зависит от естественной среды, бактерии численно преобладают над диатомовыми водорослями, а их размер (0,5-5 мкм) позволяет проникать через матрикс эукариотических клеток и попадать в кровяное русло. Так, в качестве маркеров уже предложены бактерии родов *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*.

Целью данного проекта является создание нового быстрого, точного и универсального способа определения истинности утопления на основе анализа бактериальной микрофлоры с помощью метода МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии. Для этого будет осуществлен скрининг бактериальной микрофлоры водоёмов Республики Татарстан, которая будет предложена в качестве маркеров истинного утопления в данном регионе. Идентификация микроорганизмов будет также подтверждаться методами ПЦР и секвенирования. Прямое белковое профилирование является достойным конкурентом большинству существующих методов идентификации микроорганизмов, который хорошо себя зарекомендовал и широко применяется в клинической диагностике.

S07-15

РОЛЬ *MORGANELLA MORGANII* В ЭТИОЛОГИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ АМБУЛАТОРНЫХ БОЛЬНЫХ

Марданова Айслу Миркасымовна¹, Шалавина Мария Андреевна², Арапова Анна Олеговна¹

¹Казанский (приволжский) федеральный университет, ²ООО ЛДЦ "Биомед"

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются определяющими при исследовании инфекций мочевыводящих путей, играют немаловажную роль как этиологические агенты неспецифических половых и острых кишечных инфекций, что требует мониторинга их видового состава и антибиотикочувствительности.

Был проведен анализ данных бактериологической лаборатории ООО ЛДЦ «Биомед» по результатам исследований клинических материалов амбулаторных больных по г. Казани за 2013 г. Был проведен анализ 13153 образцов различных материалов: фекалий – 3877, мочи – 3322, отделяемых половых органов женщин и мужчин – 4718 и 1236 соответственно. Выделено 7819 изолятов, из которых 2918 – грамположительные бактерии, 4824 – грамотрицательные бактерии и 77 – грибы, принадлежащие к роду *Candida*. Среди грамотрицательных бактерий 2% приходится на штаммы, принадлежащие порядку *Pseudomonadales* и 98% на представителей разных видов семейства *Enterobacteriaceae*. В течение 2013 г. из различных материалов выделено 57 изолятов *M. morganii*. По частоте встречаемости данный вид стоит на 4 месте среди видов энтеробактерий. В 43% случаев *M. morganii* выделялись в монокультуре, а в 57% – смешанной культуре. Чаще всего смешанные культуры выделялись из образцов фекалий и *M. morganii* как правило высевались вместе с *Klebsiella pneumoniae*, гемолитическими *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Известно, что значительную социальную проблему создает циркуляция в обществе штаммов энтеробактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам, что значительно осложняет терапию. Был проанализирован спектр антибиотикоустойчивости штаммов *M. morganii*. 91% выделенных изолятов оказались устойчивы к азитромицину, 77% и 74% к цефазолину и доксициклину, а 55% штаммов – к ампициллину. В тоже время 100% исследованных изолятов были чувствительны к амикацину и более 90% к таким антибиотикам как цефтазидим, ципрофлоксацин и гентамицин.

Таким образом, при назначении антибиотиков в отношении *M. morganii* следует учитывать общие тенденции роста резистентности энтеробактерий, а так же необходимо рационально подходить к антибиотикотерапии на основании тщательного микробиологического мониторинга.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ и Правительства РТ (проект №13-04-97130).

S07-16

АНАЛИЗ АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК, ОБУСЛОВЛЕННОГО ПРОЛОНГИРОВАННЫМ РАДИАЦИОННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ.

Бабикова Е.А.¹, Наумов В.А.¹, Захаржевская Н.Б.¹, Генерозов Э.В.¹, Корзенева И.Б.²

¹ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА Москва, Россия, ²ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ» г. Саров, Россия

Молекулярные нарушения (генетические, эпигенетические) лежат в основе развития радиационно-индуцированных патологий. При этом малые дозы излучения не приводят к немедленному развитию заболевания, но способствуют проявлению ген. нестабильности и накоплению мутаций. В отличие от ген. изменений, эпигенетические изучены в меньшей степени. Целью данной работы является изучение влияния пролонгированного радиационного воздействия (ПРВ) малых доз излучения на изменение паттерна метилирования ДНК.

Были сформированы три группы, две из которых включали сотрудников РФЯЦ-ВНИИЭФ, подвергшихся ПРВ гамма и бета, в третью вошли лица, не получившие РВ. Выделенная из лейкоцитарной фракции крови ДНК была подвергнута бисульфитной конверсии и проанализирована на чипе HumanMethylation450K(Illumina, США). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного пакета IMA-R (IlluminaMethylationAnalyzer).

В ходе работы произведена оценка 48512 CpG сайтов во всех группах образцов. В группах бета и гамма наибольшие отличия в метилировании выявлены в генах DHFR, MIR1977, NME7, RAD50.

DHFR	MIR1977	NME7	RAD50
нарушения в обмене фолатов и, как следствие, возникновение генетических мутаций	нарушения в процессах матричного синтеза	нарушениям репарации, обусловленные нехваткой нуклеотидфосфатов	нарушения механизма репарации при клеточном ответе на радиационный стресс

Таким образом, показано патогенное влияние радиационного излучения в малых дозах на эпигеном человека, в т.ч. на изменение метилирования генов, участвующих в важных биохимических процессах организма. Однако механизмы воздействия излучения подлежат дальнейшему изучению.

S07-17

УРОВЕНЬ ГЛУТАТИОНА, ЭКСПРЕССИЯ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛИОКСИЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ ХОМЯКОВ НА РАЗНЫХ СРОКАХ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ

Перина Е.А., Салтыкова И.В., Иванов В.В., Мосунов И.Н., Сазонов А.Э.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Хронический воспалительный процесс при инвазии *Opisthorchis felineus* и продукты жизнедеятельности, выделяемые трематодами в окружающую среду, приводят к усиленной генерации активных форм кислорода, активации перекисного окисления липидов, образованию глиоксали, метилглиоксали и других соединений с высокой реакционной способностью. Метаболизм метилглиоксали в основном осуществляется глиоксалазной системой, включающей в себя два фермента - глиоксалазу I (GLOI) и глиоксалазу II (GLOII), и требует наличия восстановленного глутатиона, который является также главным антиоксидантом клеток гепатобилиарной системы. В работе исследованы экспрессия генов GLOI, GLOII, активность этих ферментов и содержание глутатиона в печени хомяков на разных сроках инвазии *O. felineus*.

В эксперименте использовали 100 экспериментальных животных - золотистых хомяков *Mesocricetus auratus* SPF категории, которые были разделены на две группы: контрольную (40 животных) и экспериментальную (60 животных). Экспериментальным животным вводили *percos* по 50 метацеркарий *O. felineus*, выделенных из зараженной рыбы. Через 8, 12, 24, 36, 48 недель инвазии в печени животных были определены экспрессия и активность глиоксалазы I (GLOI), глиоксалазы II (GLOII), а также уровень глутатиона.

В результате на 8 неделе инвазии в печени зараженных хомяков обнаружено снижение активности и экспрессии GLOI и GLOII, при этом происходило увеличение содержания восстановленного глутатиона. На 24, 36 и 48 неделях инвазии в печени экспериментальных животных отмечается увеличение активности ферментов глиоксалазной системы и повышение уровня восстановленного глутатиона. Повышение активности GLOI и GLOII не коррелировало с экспрессией анализируемых генов и возможно обусловлено пост-трансляционной модификацией ферментов, в том числе NO-опосредованной модификацией активности и фосфорилированием. Увеличение активности GLOI и GLOII может являться адаптивной реакцией на увеличение внутриклеточных уровней метилглиоксали и SD-лактоилглутатиона, образующихся в результате окислительного стресса при хроническом воспалении, индуцированном инвазией *O. felineus*.

S07-18

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМ ДЕТОКСИКАЦИИ ПРИ СТРЕПТОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Кадкина В.А., Давидюк Ю.Н., Кравченко И.Э., Ризванов А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

Заболевания вызванные стрептококком группы А широко распространены во всем мире. К стрептококковой инфекции (группы А) относят группу заболеваний, вызываемых бактерией вида *Streptococcus pyogenes* передаваемых преимущественно воздушно-капельным путем, характеризующихся поражением верхних дыхательных путей, кожных покровов с местными нагноительными процессами и развитием постстрептококковых аутоиммунных (ревматизм, гломерулонефрит) и токсико-септических осложнений (некротический фасциит, миозит, синдром стрептококкового токсического шока, метатонзиллярный и перитонзиллярный абсцессы и др.).

Целью настоящего исследования является выявление роли полиморфных вариантов гена СУР1А1(462 Ile /Val) (rs1048943) в развитии заболевания ангиной (s. pyogenes) и рожей (erysipelas) у пациентов РТ. Для исследования использовали коллекцию периферической крови пациентов с клиническим течением ангины и рожистым воспалением, проживающих на территории Республики Татарстан в количестве 67 человек. Группа сформирована на базе ГБОУВПО КГМУ (г. Казань). Контрольная здоровая группа сравнения включала 495 человек. ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией фенолом/хлороформом и осаждение ДНК этанолом. Генотипирование полиморфных локусов проведено методом ПЦР.

Полученные данные о частотах встречаемости однонуклеотидного полиморфизма в гене СУР1А1(Ile 462Val) составляют Ile/Ile - 27% (ангина) - 35% (рожа) - 94% (контроль), Ile /Val -73% (ангина) -65% (рожа)-6% (контроль), что достоверно отличается от частот в контрольной группе. Уровень значимости при ангине $p < 0.05 \chi^2 = 261.41 > 5.99$ и роже $p < 0.05 \chi^2 = 212.5 > 5.99$. Это позволяет предположить корреляцию между данной мутацией и заболеванием ангиной и рожей. Нами показано влияние носительства генотипа на изменение показателей уровня детоксикации.

Таким образом, генотипирование полиморфизма СУР1А1(462 Ile /Val) может являться дополнительным маркером ранней диагностики и профилактики ангины и рожи у населения РТ.

S07-19

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИНДРОМА ЛИНЧА В РОССИИ

Шубин В.П., Цуканов А.С., Сачков И.Ю., Ачкасов С.И., Шелыгин Ю.А., Кашников В.Н, Фролов С.А., Поспехова Н.И.

ФГБУ «ГНЦК» Минздрава РФ

Около 3% от всех случаев рака толстой кишки (РТК) связывают с синдромом Линча. В настоящее время известны гены системы репарации ошибочно спаренных оснований (MMR), герминальные мутации в которых приводят к отсутствию кодируемого белка и развитию этого синдрома. На фоне отсутствия белков системы MMR в опухоли регистрируется высокий уровень микросателлитной нестабильности (MCH). Основное число мутаций находят в генах *MSH1*, *MSH2*, *MSH6* и существенно реже в *MLH3*, *PMS1*, *PMS2* и *EPCAM*.

Цель. Изучить частоту и спектр мутаций в генах *MSH1*, *MSH2*, *MSH6* среди молодых Российских пациентов.

Материалы и методы. Выборка больных РТК, первостепенными характеристиками которой было 2 и более случаев рака в семье и молодой возраст (≤ 42 лет), состояла из 42 человек. Определение MCH в опухоли проводилось фрагментным анализом по 5 маркерам (NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26). Поиск мутаций в генах MMR проводился с помощью секвенирования.

Результаты. MCH высокого уровня (MSI-H) выявлена в 20/42 (47%) опухолевых образцах. MSI-H считались те опухоли у которых нестабильность выявлена по 2 и более маркеров. Среди 20 пациентов с MSI-H статусом обнаружено 11 (55%) герминальных мутаций. Семь мутаций локализовались в гене *MLH1* – p.R100X, p.R100P, p.618delAAG (2 случая), c.1896+1G/C, p.Cys680Arg и p.691delAT. Три мутации найдены в гене *MSH2* – c.942+3A/T, p.K392X, p.K430X и одна в гене *MSH6* – p.T745N. В семье пациента с мутацией c.942+3A/T кроме рака толстой кишки наблюдалась опухоль саленных желез, что позволило отнести этот случай к синдрому Мюир-Торре (Muir-Torres syndrome). Так же можно отметить, что при мутациях в генах *MLH1* и *MSH2* MCH выявлена по пяти маркерам, а при мутации в гене *MSH6* по 3.

Заключение. Все опухоли при синдроме Линча имеют статус MSI-H. Больше половины мутаций найдены в гене *MLH1* (63%), треть мутаций пришлось на ген *MSH2* (27%) и одна мутация выявлена в гене *MSH6*. Предложенные критерии: 2 и более раков в семье и молодой возраст (≤ 42 лет) имеет высокую эффективность, что может повысить выявляемость данного синдрома и своевременно применить правильную тактику лечения.

S07-20**ВЕЗИКУЛЫ, КАК МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА ТОКСИНА *BACTEROIDES FRAGILIS* В ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ****Захаржевская Н.Б.¹, Гущина Е.А.², Вишняков И.А.³, Говорун В.М.¹****¹ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва, РФ, ²ФГУ "НИИ вирусологии им. Д.И.****Ивановского", Москва, РФ, ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, РФ**

Везикулы являются одним из механизмов транспорта токсинов грамотрицательных бактерий в окружающую среду. Для *Bacteroides fragilis* механизм секреции токсина (*BFT*) не известен. Целью данной работы являлась оценка возможного участия везикулярного транспорта в доставке токсина *Bacteroides fragilis* в окружающую среду.

В работе использованы токсигенный и нетоксигенный штаммы *Bacteroides fragilis*, а также культура клеток *HT-29*. Выделение везикул проведено методом ультрацентрифугирования при 120000g. Идентификации токсина в препаратах проведена методом иммуноблота с применением поликлональных антител. Произведена оценка протеолитической активности препарата везикул. В культуральной среде везикулы визуализированы с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), а также методом негативного контрастирования (НК). Определение локализации *BFT* в препарате культуральной среды осуществлено методом ТЭМ, с использованием антител к токсину, конъюгированных с частицами золота диаметром 10нм.

Методом иммуноблота в препарате везикул был определен каталитический домен *BFT*, а при ингибировании сериновых протеаз в культуральной среде с использованием PMSF - полноразмерный белок. Протеолитическая активность препарата везикул токсигенного штамма выявлена в ходе полного расщепления клеточного Е-кадгерина культуры клеток *HT-29*. Методом ТЭМ, а также НК определен размер везикул от 20 до 50 нм., а с применением антител, конъюгированных с частицами золота, определена премебранная локализация *BFT*. Совокупно результаты работы свидетельствуют в пользу возможного транспорта токсина *BFT* в составе везикул.

S07-21

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНВАЗИВНОЙ СПОСОБНОСТИ PROTEUS MIRABILIS И MORGANELLA MORGANII

Замалютдинова Наиля Марсовна, Марданова Айслу Миркасымовна

**Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
 медицины и биологии, кафедра микробиологии**

Proteus mirabilis и *Morganella morganii* – оппортунистические патогены, способные вызывать инфекции различной локализации, но чаще всего – инфекции мочевыделительной системы. Известно, что более 70% случаев образования камней в почках инфекционной этиологии связано с *P. mirabilis* и может быть связано с инвазией клеток возбудителя. В отличие от таких хорошо изученных видов энтеробактерий как *Salmonella*, *Shigella* и *Yersinia*, данных о механизме инвазии *P. mirabilis* и *M. morganii* нет. Цель работы – характеристика инвазивной способности штаммов клинических изолятов *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM. Инвазию исследовали с помощью количественного гентамицинового метода и конфокальной микроскопии.

Исследовали способность к инвазии штаммов *M. morganii* ZM и *P. mirabilis* 5127-1 в клетки HeLa-M (эпителиоидная карцинома шейки матки человека) и показали, что оба штамма обладают способностью эффективно инвазировать в эукариотические клетки. Эффективность инвазии зависит от возраста бактерий, инфицирующей дозы и продолжительности времени инкубации бактерий с культурой клеток. При соотношении эукариотических клеток к бактериям, равным 1:10, оба штамма проявляли сходную эффективность инвазии: 30 и 40%. Однако при повышении инфекционной дозы бактерий в 10 раз (соотношение клеток 1:100), эффективность инвазии *M. morganii* ZM повышалось до максимальной, а в случае штамма *P. mirabilis* 5127-1 количество внутриклеточных бактерий не превышало 35%. Показали, что *P. mirabilis* вызывает открепление клеток HeLa от субстрата после инкубации культуры с бактериями, что могло приводить к снижению количества внутриклеточных бактерий. В случае *M. morganii* ZM, инкубация клеток HeLa с бактериями не приводило к заметному снижению количества клеток в монослой культуры. Такое различие в эффекте разных штаммов бактерий на эукариотические клетки может быть связано с цитотоксическим эффектом, проявляющимся в нарушении адгезивных свойств клеток. Способность к инвазии *M. morganii* ZM и *P. mirabilis* 5127-1 в эукариотические клетки HeLa-M также подтверждена с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ и Правительства РТ (проект №13-04-97130) и средств субсидии, выделенной для выполнения государственного задания (проект № 14-83(0211/02.11.10083.001)).

S07-22

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПОИСК АССОЦИАЦИЙ

Рогова Ольга Борисовна, Гришанова Алевтина Юрьевна, Ляхович Вячеслав Валентинович
ФГБУ "НИИМББ" СО РАМН. Новосибирск, Россия

Введение. Р-гликопротеин, продукт гена *MDR1*, принадлежит к семейству АТФ-зависимых мембранных транспортеров, вовлеченных в активный транспорт препаратов, входящих в стандартные протоколы химиотерапии, применяемые при лечении рака молочной железы (РМЖ). Полиморфизм в гене *MDR1* является причиной изменения активности Р-гликопротеина, может влиять на распределение и биодоступность его субстратов и обеспечивать индивидуальную реакцию пациентов на проводимую химиотерапию. Поэтому поиск прогностических генетических факторов эффективности противоопухолевой терапии является важной актуальной задачей.

Цель работы: исследование функционально значимых полиморфных вариантов гена *MDR1* *C6+139T*, *C1236T*, *G2677T*, *C3435T* у больных РМЖ и анализ ассоциаций этих полиморфизмов с клиническим ответом на проводимую неоадьювантную химиотерапию (НАХТ).

Материалы и методы. Полиморфизм гена *MDR1* исследован методом ПДРФ-анализа образцов ДНК 395 женщин с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀, находившихся на лечении в клинике ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН и получивших в неоадьювантном режиме 2-4 курса химиотерапии по стандартным схемам. Для анализа сформировано 2 группы пациентов в соответствии с результатами НАХТ: группа с положительным эффектом от лечения включала больных с полной, частичной регрессией и стабилизацией заболевания; группа с отрицательным эффектом от лечения – больных с прогрессированием заболевания. Ассоциацию генотипов с ответом на лечение оценивали по величине отношения шансов.

Результаты. Частоты встречаемости мутантных аллелей гена *MDR1* в исследованной выборке составили: *6+139T* - 0.38, *1236T* - 0.39, *2677T* - 0.38, *3435T* - 0.51 и значимо не отличаются от описанных в литературе частот для европеоидов.

Анализ взаимосвязи полиморфных вариантов гена *MDR1* (*C6+139T*, *C1236T*, *G2677T*, *C3435T*) с известным эффектом от НАХТ у больных РМЖ, в том числе в зависимости от клинических характеристик пациента: наследственной онкологической отягощенности, клинической формы, стадии злокачественности и гистологического типа опухоли не выявил статистически значимых ассоциаций.

Заключение. Изученные полиморфные варианты гена *MDR1* не являются прогностическими генетическими факторами эффективности НАХТ у больных РМЖ.

Работа выполнена на базе ЦКП «ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ».

S07-23

АНАЛИЗ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕДИКТОРОВ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Насибуллин Т.Р.¹, Ягафарова Л.Ф.¹, Тимашева Я.Р.¹, Туктарова И.А.¹, Эрдман В.В.¹,
 Ягафаров И.Р.², Мустафина О.Е.¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, ²МСЧ
 ОАО "Татнефть" и г. Альметьевска, г. Альметьевск, Россия

В этнически однородной группе (татары г. Альметьевск) с целью выявления информативных предикторов развития инфаркта (ИМ) проведён анализ распределений частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов, чьи продукты задействованы в патогенезе заболевания – ген *CCL2* (rs991804_5357C>T и rs1024611_2518A>G), ген *CCR2* (rs1799864_V64I), ген *CX3CR1* (rs3732378_M280T), ген *CXCL12* (rs1801157_12197A>G), ген *CCR5* (rs333_Δ32I/D), ген *CXCR4* (rs2471859_1627C>T), ген *CXCL1* (rs4074_1036A>G), ген *CXCR2* (rs1126579_10722C>T), ген *CXCL8* (rs4073_251A>T) ген *CD14* (rs2569190_260C>T). Группу больных с ИМ составили 217 мужчин перенёсших ИМ в возрасте от 30 до 65 лет, контрольную группу – 250 мужчин в возрасте от 35 до 65 лет. С помощью метода Моте-Карло и цепей Маркова (программа APSampler) проведён анализ ассоциаций сочетаний изученных полиморфных маркеров с ИМ. Для проверки статистической значимости полученных результатов использовался пермутационный тест. Из полученных сочетаний наиболее значимыми предикторами ИМ оказались сочетания *CXCR4**C+*CD14**C+*CCL2*_rs991804*C+*CCR5**I/D (больные 12.9%, контроль 2.4% $P_{\text{perm}}=0.00004$ OR=6.02 95%CI 2.44–14.05), *CXCR2**C+*CD14**C+*CXCL12**G+*CCL2*_rs991804*C+*CCR5**D (больные 12.44%, контроль 2.4% $P_{\text{perm}}=0.0003$ OR=5.78 95%CI 2.34–14.28), *CD14**C+*CCL2*_rs991804*C/C+*CCR5**I/D (больные 10.6%, контроль 2% $P_{\text{perm}}=0.0017$ OR=5.81 95%CI 2.17–15.56), *CXCR2**T/T+*CCL2*_rs991804*C/T (больные 6.45%, контроль 17.2% $P_{\text{perm}}=0.004$ OR=0.33 95%CI 0.17–0.63), *CXCL8**A+*CXCR2**C+*CD14**T+*CXCR4**C+*CCR2**V (больные 14.29%, контроль 4.8% $P_{\text{perm}}=0.0051$ OR=3.31 95%CI 1.65–6.61), *CXCL1**A/G+*CD14**T+*CXCR4**C+ *CCL2*_rs1024611*G (больные 4.6%, контроль 0% $P_{\text{perm}}=0.012$ OR=8.98 95%CI 2.56–31.48).

S07-24**ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД И СОМАТИЧЕСКИЕ KRAS/BRAF-МУТАЦИИ В ОБРАЗЦАХ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ, ОСЛОЖНЕННОГО ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ КАНЦЕРОМАТОЗОМ**

Поспехова Н.И., Шелыгин Ю.А., Ачкасов С.И., Сушков О.И., Цуканов А.С., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шубин В.П.

ФГБУ "Государственный научный центр колопроктологии" Минздрава РФ, Москва, Россия

Цель. Перитонеальный канцероматоз наблюдается примерно у 3-10% больных раком толстой кишки (РТК). Прогноз заболевания в этих случаях плохой, пятилетняя выживаемость составляет не более 5%. В последнее время накапливаются данные, свидетельствующие, что в механизмах прогрессии и инвазии рака принимает участие сложный многоступенчатый процесс известный как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). В результате развития ЭМП фенотип опухолевых клеток трансформируется из эпителиального в мезенхимальный. Цель проведенного исследования состояла в изучении процесса ЭМП и соматических мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* в образцах РТК, осложненного перитонеальным канцероматозом.

Методы. Проанализировано 20 случаев РТК с перитонеальным канцероматозом. От каждого пациента получено три образца: опухоль, канцероматозный узел и нормальная слизистая оболочка толстой кишки. Наличие ЭМП определяли на основе экспрессии 5 генов - *ZEB1*, *ZEB2*, *CDH1*, *VIM*, *SNAI1* (5-genesignature). Уровень генной экспрессии анализировали методом ПЦР в реальном времени. Мутации в генах *KRAS/BRAF* детектировали прямым секвенированием.

Результаты. Процесс ЭМП детектирован в 7 из 20 образцов первичной опухоли (35%). В тоже время частота ЭМП в образцах канцероматозного узла составила 95% (19/20). Мутации в *KRAS* обнаружены в 55% РТК (11/20). Мутация *BRAF-V600E* выявлена в 3 случаях (15%). Суммарная частота мутаций в обоих генах составила 70% (14/20).

Закключение. Детекция процесса ЭМП в подавляющем большинстве образцов канцероматозного узла подтверждает агрессивность и плохой прогноз РТК мезенхимального подтипа. Ассоциация ЭМП с перитонеальным канцероматозом демонстрирует высокий метастатический потенциал ЭМП-позитивных опухолей толстой кишки. Исследованные образцы РТК также характеризуются значительно повышенной частотой соматических *KRAS/BRAF*-мутаций, что подтверждает интерпретацию их наличия как фактора худшего прогноза.

S07-25

ВЛИЯНИЕ ВНЕ- И ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ NEDD9 НА РАЗВИТИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Рашид Габбасов¹, Лора Э. Бикль², Шейн У. О'Брайн², Сэмюэль Литвин², Сачико Сино³, Эрика А. Големис², Дениз С. Конолли²

¹*Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия,* ²*Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США,* ³*Университет Токио, Токио, Япония*

Повышенная экспрессия белка NEDD9 (Neuralprecursorcell Expressed Developmentally Downregulated 9) связана с рядом онкологических заболеваний, однако о роли NEDD9 в развитии эпителиального рака яичников (ЭРЯ) известно мало. ЭРЯ - наиболее опасный рак женской половой системы, занимающий пятое место среди причин онкологической смертности российских женщин. Обычно ЭРЯ развивается бессимптомно, и на момент диагностики пациент имеет множественные метастазы в перитонеальной полости. В связи с этим, поиск новых диагностических маркёров и мишеней для химиотерапии – приоритетное направление борьбы с ЭРЯ.

Цель исследования – определить влияние экспрессии NEDD9 на развитие ЭРЯ. Для достижения поставленной цели, ЭРЯ моделировался путём имплантации клеток рака яичника мыши (MOVCAR) в яичники мышей линии *MISIR-Tag-Low*. В задачи исследования входило определить, зависит ли развитие ЭРЯ от экспрессии NEDD9 1) вне опухоли и 2) внутри опухоли.

Для решения первой задачи, мы провели серию из 3-х имплантаций *Nedd9^{+/+}* клеток линии 5009 в яичники *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* мышей (общее *n* мышей каждого генотипа = 30). В результате, не было обнаружено значимых различий у *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* мышей в скорости роста опухолей, количестве сопровождавших их метастазов и частоте появления асцитов.

Для решения второй задачи, мы имплантировали *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* клетки в яичники *Nedd9^{+/+}* мышей, смоделировав потерю *Nedd9* внутри опухоли в организме с неизменённым генотипом. В 3-х независимых экспериментах использовали 6 клеточных линий (*Nedd9^{+/+}*: 5009, 6111, 8248; *Nedd9^{-/-}*: 136, 145, 168), каждую из которых имплантировали в 10 мышей. Отсутствие внутриопухолевой экспрессии *Nedd9* привело к снижению скорости роста опухолей (74,0±1,8 и 102±7,4 дня; *p*<0,0001; здесь и далее показаны средние ± SEM для опухолей с генотипами *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* соответственно), уменьшению количества метастазов в перитонеальной полости (69,0±3,7 против 30,7±4,3; *p*<0,001) и уменьшению частоты появления асцитов (100% против 32%, *p*<0.0001).

Результаты исследования указывают на то, что: а) экспрессия NEDD9 ускоряет рост и распространение ЭРЯ, б) принципиально возможно использовать NEDD9 и/или связывающихся с ним белки в качестве мишеней для химиотерапии ЭРЯ, и в) NEDD9 не подходит на роль диагностического маркёра ЭРЯ.

S07-26

ПОИСК АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ALU-ИНСЕРЦИОННЫХ ЛОКУСОВ С ДОЛГОЛЕТИЕМ.

Мустафина О. Е., Насибуллин Т. Р., Сомова Р. Ш., Эрдман В. В., Каримов Д. Д.
 Институт Биохимии и Генетики, Уфа, РФ

Среди гипотез о причинах и механизмах старения особое внимание привлекает гипотеза о роли нестабильности генома. Предполагается, что нестабильность оказывает глубокое влияние на экспрессию генов, приводит к нарушению процессов жизнедеятельности клетки и в итоге к старению организма. Одним из пусковых механизмов нестабильности генома является активация *Alu*-элементов под влиянием стрессоров. Геном человека содержит приблизительно 10^6 копий ретропозонов семейства *Alu*, широко представлен полиморфизм, обусловленный их вставкой или выпадением. Исходя из этих фактов возникает вопрос: может ли *Alu*-инсерционный полиморфизм влиять на вариабельность продолжительности жизни человека?

Цель исследования состояла в анализе ассоциаций *Alu*-инсерционных локусов с долголетием человека.

В работе была использована выборка из 1722 человек, в возрастное 20 – 109 лет, этнических татар, проживающих в РБ. Выделение ДНК осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции; генотипирование проводилось методом ПЦР; статистический анализ производился с использованием ПО SPSSV. 13.0. Для оценки вероятности наблюдения генотипов использовался метод логистической регрессии, для сравнения частот аллелей и генотипов использовался точный двусторонний тест Фишера.

Результаты: Охарактеризовано распределение частот генотипов и аллелей *Alu*-элементов Ya5ac1986 в гене *COL13A1* (10q21.3) и 1104685458125 в гене *Evi5* (1p22.1). Частоты генотипов *COL13A1**/I, *COL13A1**/D и *COL13A1**/D составляли 55.76%, 36.36%, и 7.87% соответственно. Частоты генотипов *EVI5**/I, *EVI5**/D и *EVI5**/D составляли 88.35%, 10.04%, и 1.61% соответственно. Эмпирическое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому ($p=0.0774$ и $p=0.4464$ соотв.). При подразделении выборки по гендерным и возрастным особенностям статистически значимых различий не выявлено.

Выявлена ассоциация с возрастом полиморфного *Alu*-инсерционного локуса Ya5-MLS19, гена *LAMA2* (6q22.33) у женщин. Частоты генотипов *LAMA2**/I, *LAMA2**/D и *LAMA2**/D в популяции составляли 18.78%, 48.1%, и 33.13% соответственно ($p=0.4754$). Результаты попарного сравнения разных возрастных групп показало достоверные различия в частотах генотипов *LAMA2**/I и *LAMA2**/D в группе женщин-долгожителей в сравнении с остальными женщинами. Частоты генотипов *LAMA2**/I, *LAMA2**/D и *LAMA2**/D в группе долгожительниц составляли 15,43%, 64,57%, и 14,34% соответственно ($p=0,0001$). Результат подтверждается данными логистического регрессионного анализа.

Таким образом, шансы дожития до возраста долголетия выше у носительниц генотипа *LAMA2**/D и ниже у носительниц генотипа *LAMA2**/D.

Работа поддержана грантом РФФИ-Поволжье №14-04-97094.

S07-27

АНАЛИЗ АССОЦИИИ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНА IL7RA С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Туктарова И.А.¹, Насибуллин Т.Р.¹, Мухамедьярова Г.², Мустафина О.Е.¹, Заплахова О.В.³, Бахтиярова К.З.³

¹Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Россия, Уфа, ²БГПУ

им.М.Акумлы, ³Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

С целью изучения молекулярно-генетических основ рассеянного склероза (РС) проведён сравнительный анализ распределений частот гаплотипов гена альфа цепи рецептора к интерлейкину 7 (IL7RA, 5p13.2) в группе больных и контроля по полиморфным маркерам 598(5)I/D (rs10624573) и T66I (rs 1494558).

Лиганд-рецепторная пара IL-7 – IL-7Ra является ключевым фактором в пролиферации и жизнеспособности Т- и В- лимфоцитов. [SchlisselM.S. et al., 2000]. Согласно сведениям литературы с РС ассоциирован полиморфный локус rs 6897932 в экзоне 6 гена IL7RA [HaflerD.A. et al., 2007]. Было показано, что этот полиморфизм затрагивает альтернативный сплайсинг экзона 6 и, как следствие, обуславливает изменение соотношения растворимой и связанной с мембраной форм рецептора [GregoryS.G. et al., 2007].

Выборка больных РС была сформирована из 315 неродственных пациентов, татар и башкир по этнической принадлежности (соответственно 229, 86) в возрасте 15-55 лет ($35,5 \pm 10,69$ лет) с достоверным диагнозом по критериям McDonald, проживающие в республике Башкортостан, находящиеся под наблюдением в РЦРС. В контрольную группу были отобраны 484 человек (277 татар и 207 башкир по этнической принадлежности) без признаков неврологической патологии в возрасте от 15 до 57 лет ($38,79 \pm 9,33$). Статистический анализ проводили с использованием программы Haploview 4.2. Частоты гаплотипов определяли с помощью EM алгоритма.

Обнаружено, что в обеих этнических группах у больных РС в отличие от контрольной группы повышена частота гаплотипа *D*I (татары: 16.7% против 12.6% соответственно, $\chi^2 = 4.232$, $P=0.0397$, OR =1.39; башкиры 20.5% против 12.0% соответственно $\chi^2 = 7.082$ $P=0.0078$ OR =1.88)), а частота гаплотипа *D*Т понижена (татары: 44.0% против 52.8 % в соответственно $\chi^2 = 9.486$ $P=0.0021$ OR =0.7; башкиры 39.8% против 50.5% соответственно $\chi^2 = 5.627$ $P=0.0177$ OR =0.65).

Таким образом, гаплотип *D*I гена IL7RA может рассматриваться в качестве маркера риска РС у этнических татар и башкир.

S07-28

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ФИЛАГГРИНА У ПАЦИЕНТОВ С КРАПИВНИЦЕЙ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Гималова Г.Ф.¹, Карунас А.С.¹, Хантимерова Э.Ф.², Загидуллин Ш.З.², Хуснутдинова Э.К.¹

¹*Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия, ²ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа, Россия*

Крапивница – заболевание преимущественно аллергического генеза, характеризующееся быстрым появлением на коже зудящих высыпаний, волдырей и отека. Показана многофакторная природа данного заболевания, обусловленная как генетической предрасположенностью, так и влиянием факторов окружающей среды.

Филаггрин является основным компонентом рогового слоя кожи, вовлеченным в поддержание барьерной функции эпителия. Мутации с потерей функции в гене филаггрина *FLG* являются причиной нарушения эпидермального барьера и предрасполагают к развитию atopических заболеваний.

В нашем исследовании были проанализированы две мутации с потерей функции (*c.2282del4* и *p.R501X*) в гене *FLG* у пациентов с крапивницей и здоровых доноров из Республики Башкортостан. Группу больных составили 104 человека различного этнического происхождения (36 русских, 30 татар, 32 башкира и 6 метисов). Контрольная группа включала 106 индивидов без признаков atopических заболеваний (24 русских, 18 татар, 4 башкир и 60 метисов). Детекция мутаций производилась с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа.

В группе больных мутация *c.2282del4* встречалась у двоих: у индивида татарской этнической принадлежности с острой формой заболевания и индивида русской этнической принадлежности – с хронической. Частота гетерозиготного носительства делеции – 1,92%. В контроле мутация также была обнаружена у двоих (1,89%).

Мутация *p.R501X* выявлена у трех больных: у индивидов татарского и смешанного этнического происхождения с острой крапивницей и индивида башкирской этнической принадлежности с хронической крапивницей. Частота гетерозиготного носительства мутации в группе больных составила 2,88%. В контроле мутация *p.R501X* обнаружена у одного индивида русской этнической принадлежности (0,94%).

Исследования мутаций в гене *FLG* у больных крапивницей ранее не проводились. Тем не менее, множество работ посвящено изучению мутаций в гене *FLG* у больных atopическим дерматитом (АД). В частности, показано, что делеция *c.2282del4* встречается в европейских популяциях с частотой 15–20% – значительно чаще, чем в нашей выборке. Мутация *p.R501X* у больных АД из ряда стран Европы встречается редко.

В результате нашей работы статистически значимых различий в частотах встречаемости исследованных мутаций в гене филаггрина у больных крапивницей и здоровых индивидов не обнаружено.

S07-29

PEPTIDOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH GUILLAIN-BARRE SYNDROME

O.M. Ivanova, R.H. Ziganshin, G.P. Arapidi, I.V. Azarkin, S.I. Kovalchuk, V.M. Govorun
IBCh RAS, Moscow

Guillain-Barre syndrome (GBS), or acute autoimmune inflammatory polyradiculoneuropathy, is a rare but one of the most serious illnesses of peripheral nervous system. It is defined as a paralytic, demyelinating disorder, characterized by massive lymphocytic infiltration and damaging of myelin sheath of peripheral nerves. GBS is a monophasic, self-limiting disease, which is characterized by full rehabilitation of patients in most cases. Two major subtypes of GBS, which differ from each other by clinical manifestations and, to all appearance, have different pathogenesis are known: acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AIDP) and acute motor axonal neuropathy. According to the data of a number of studies various virus or bacterial infections precede considerable part of GBS cases. *Campylobacter jejuni*, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and *Mycoplasma pneumoniae* are among the most often occurring infectious agents, which could trigger GBS. There are some suggestions about recruitment of molecular mimicry mechanisms and cytokine stimulation in pathogenesis of GBS. *Campylobacter jejuni* is regarded as the most probable trigger of axonal forms of GBS. Pathogenesis of the most prevailing form of GBS – AIDP, is mostly unknown until now.

Although GBS involves peripheral nerves only, this disease also known to be accompanied by increase in protein concentration in cerebrospinal fluid (CSF). But little is known about the protein and peptide composition of CSF during GBS progression until now. To identify the change in CSF proteome and peptidome composition which are associated with GBS, we compared CSF samples from 13 GBS patients and 20 patients with non-neurological diseases (Control).

The proteome analysis of CSF samples of both groups revealed 1541 proteins, and 491 of them were specific for GBS samples. As a result of peptidome analysis, 2562 peptides representing 773 proteins were identified in CSF samples. 1873 peptides derived from 591 proteins were specific for GBS samples.

Mapping of lists of proteins which were identified in the course of proteome and peptidome studies of CSF on KEGG and GO pathway databases revealed clusters of the interacting proteins which may be associated with pathogenesis of GBS.

S07-30

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 3: RHOA, GPX1, USP4, DAG1, NKIRAS1 – В ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.П. Казубская¹, В.И. Логинов², И.В. Пронина², А.М. Бурденный², Д.С. Ходырев³, Э.А. Брага²,
 Н.Е. Кушлинский¹.

¹ *Российский Онкологический Научный Центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Российская Федерация, 115478, Москва;* ² *Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, Российская Федерация, 125315, Москва;* ³ *Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Российская Федерация, 117545, Москва*

Эпигенетическая модификация с участием метилирования промоторных CpG-островков служит тонким и динамичным механизмом регуляции экспрессии генов в опухолях. Повышенная и пониженная экспрессия и изменение статуса метилирования гена рассматривают как первичные критерии онкогенной или супрессорной функции гена и как факторы прогноза рака. Цель исследования. Оценка вклада метилирования в регуляцию экспрессии группы функционально важных генов хромосомы 3 при раке молочной железы (РМЖ); определение новых генов с чертами онкогенов или супрессоров, перспективных как прогностические маркеры. Методы. Образцы опухолевой и окружающей гистологически неизменной ткани от 69 больных РМЖ собраны и клинически охарактеризованы в РОНЦ РАМН. Содержание мРНК генов определяли методом полуколичественной ОТ-ПЦР. Анализ метилирования ДНК проводили с применением двух метилчувствительных рестриктаз HpaII и HhaI, и последующей ПЦР. Результаты. Показана двоякая роль метилирования у генов GPX1, NKIRAS1, RHOA, DAG1 и USP4 с преобладанием образцов опухолей с повышенной экспрессией, что характерно для онкогенов. Впервые установлена значимая корреляция между изменением уровня мРНК и структурными изменениями (метилированием /деметилированием и делециями / амплификациями) ($p < 10^{-17}$ по Спирману) для генов GPX1, NKIRAS1 и RHOA, и предварительно – для DAG1 и USP4. Вклад метилирования в дерегуляцию экспрессии детектирован у NKIRAS1 в 69% (18/26), DAG1 – 67% (4/6), USP4 – 83% (5/6), GPX1 – 34% (11/32), RHOA – 16% (5/32) случаев РМЖ. Онкогенные свойства наиболее выражены у генов NKIRAS1, RHOA и DAG1, у которых доминировал повышенный уровень мРНК, ассоциированный с деметилированием или амплификацией локуса. Заключение. Впервые показано, что изменение статуса метилирования генов GPX1, NKIRAS1, RHOA, DAG1 и USP4, может влиять на уровень экспрессии в значительной доле случаев РМЖ. Выявленные особенности генов NKIRAS1, RHOA и DAG1 (повышенный уровень мРНК, деметилирование или амплификация) могут быть использованы для разработки новых подходов к прогнозированию РМЖ.

Ключевые слова: регуляция экспрессии генов, метилирование/деметилирование, рак молочной железы

S07-31

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПОСМЕНОПАУЗАЛЬНОМУ ОСТЕОПОРОЗУ

Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К.

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия

Остеопороз – системное заболевания скелета, характеризуется снижением костной массы, микроархитектурными нарушениями костной ткани и является одной из значимых медицинских проблем с выраженным влиянием на экономику и качество жизни общества. Выявление генетических маркеров заболевания позволит разработать профилактические мероприятия, предупреждающие развитие переломов.

Проведено изучение 155 локусов, расположенных на всех хромосомах человека, кроме Y хромосомы, (96 локусов генотипированы в рамках международного консорциума «GEFOS») у 845 женщин постменопаузального возраста татарского и русского происхождения. Исследование проводилось с использованием двух подходов: изучение кандидатных генов и репликация результатов GWAS исследований.

В результате исследования кандидатных генов обнаружена значимость полиморфных вариантов *rs2412298* и *rs1800012* (*COL1A1*), *rs2228570* (*VDR*), (*TAA*)_n, гена *DBP* в развитии переломов у женщин русской этнической принадлежности, *rs3102734* и *rs3134069* (*OPG*), *rs2118784* (*CYP19A1*) у женщин татарского происхождения, локусы *rs2277268* (*LRP5*), *rs2412298* (*COL1A1*), *rs9340799* (*ESR1*) ассоциированы с остеопорозом.

Репликация результатов GWAS исследований показала, что с переломами в общей выборке ассоциированы локусы *rs5926033* (Xp22.11), *rs227584* (*CI7orf53*) и *rs4869742* (*C6orf97*), *rs163879* – вблизи гена *DCDC5*, *rs13272568* – вблизи гена *PKIA*; у татар – локусы *rs6959212* вблизи гена *STARD3NL*, *rs1566045* (*SALL1*), *rs7812088* (*ABCF2*) и *rs2016266* (*SP7*); у русских – *rs2295294* (*UBE4B*), *rs4820539* (*RTDR1*), *rs1864325* вблизи гена *MAPT*, *rs4957742* рядом с геном *EFNA5*, *rs12995369* (*CDK15*), *rs17284960* (*5q34*) и *rs11788458* (*9q31.3*).

Обнаружена ассоциация локусов *rs4792909* (*SOST*), *rs1286083* (*RPS6KA5*), *rs1026364* (*KIAA2018*) с низкой МПКТ в общей выборке, у русских так же *rs4792909*, *rs1286083*, *rs7217932* и *rs964181* и локус *rs5934507* вблизи гена *FAM9B*, у татар – *rs7257450* (*PLVAP*), *rs4817775* (*CBR3*), *rs4492531* (*MAGEE2*), *rs479336* (*DNM3*), *rs13272568* (*PKIA*), *rs4820539* (*RTDR1*) и *rs730402* (*BCL11A*).

Большинство из этих локусов расположены в генах, кодирующих белки, участвующие в системе RANK-RANKL-OPG, дифференциации мезенхимальных стволовых клеток и Wnt сигнальном пути, однако есть локусы, расположенные в межгенных участках и в генах с неизвестной ролью в костной биологии.

S07-32**АНАЛИЗ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ
БЕРЕМЕННОСТИ****Коваленко К.А., Фомина Н.В., Машкина Е.В.*****Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия***

Одной из ведущих причин ранних эмбриональных потерь принято считать генетический фактор. Определенный вклад в развитие патологических состояний при беременности могут вносить полиморфные варианты ряда генов. Целью данной работы было оценить вклад полиморфизма генов фолатного цикла, факторов свертывающей системы и цитокинов в повышение риска невынашивания беременности ранних сроков. Для исследования использовали образцы ДНК 122 женщин с НБ в первом триместре. В контрольную группу вошли 114 женщин с физиологически протекающей беременностью. Анализировали аллельные варианты генов *IL-1 β* , *IL-10*, *TNFA*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *ITGB3*, *ITGA2*, *FGB*, *SERPINE1*. По большинству исследованных генов не выявлено ассоциации отдельных полиморфизмов с повышенным риском НБ. Однако установлено, что риск невынашивания беременности возрастает в 2 раза у женщин, имеющих в своем генотипе полиморфные варианты генов *MTRR*, *MTR*, *ITGA2*, *IL-1 β* . Еще более высокий риск характерен для лиц, у которых полиморфизм по генам *MTRR*, *MTR* сочетается с полиморфизмом по гену *SERPINE1* и *IL-1 β* . По данным литературы известно, что повышенный уровень гомоцистеина способствует высвобождению таких молекул как *NF-kB*, *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*. С другой стороны показано, что повышение уровня провоспалительных цитокинов способно нарушать процессы формирования трофобласта в том числе и путем изменения концентрации факторов коагуляции. Таким образом, установлено, что риск потери беременности в первом триместре повышен у женщин, имеющих полиморфные варианты генов фолатного обмена, факторов свертывающей системы крови и провоспалительных цитокинов.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта 6.98.2014/К Министерства образования и науки Российской Федерации.

S07-33**ЛЕЙКОЗ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ИММУНОФЕНОТИП ПРИ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ В-ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ****Вильчевская Е.В., Конашенкова В.В., Михайличенко В.Ю.****ГУ "Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины", Донецк, Украина**

Мониторинг минимальной резидуальной болезни (МРБ) основан на выявлении популяции клеток с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ), характерным для опухолевых клеток и никогда не встречающийся на нормальных. В данной работе проанализирована экспрессия применяемых для мониторинга МРБ антигенов CD10, CD58, CD34, CD38 на бластных клетках В-лимфобластного лейкоза детского возраста до начала и в ходе антилейкемического лечения. В образцах костного мозга 68 пациентов с первичным В-линейным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) оценивали параметры экспрессии антигенов CD34 и CD38 на CD19+В-лимфоблестах: в момент диагностики лейкоза (0-й день) и во время определения минимальной резидуальной болезни (МРБ) на 15 и 33 дни индукционной терапии с целью оценки возможности применения данных антигенов как маркеров лейкоемической стволовой клетки (ЛСК). В ходе работы установлено, что в начале заболевания количество клеток с коэкспрессией CD34⁺/CD38⁺ составило около 79%, а CD34⁺/CD38⁺ не более 2%. При оценке МРБ высокое процентное содержание как CD34⁺/CD38⁺, так и CD34⁺/CD38⁺ среди CD19⁺ лимфобластов ассоциировалось с худшим ответом на терапию. Возможно, популяции клеток CD34⁺/CD38⁺, а также CD34⁺/CD38⁺ могут обладать потенциальной лейкоемической активностью.

S07-34

**РОЛЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И АНТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЦИТОКИНОВ В ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ БЛЯШКИ****Белоцерковская М.А., Михайличенко В.Ю., Яснопольская Н.В.****ГУ "Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН
Украины", Донецк, Украина**

Цель исследования – провести параллели между данными УЗИ и уровнем цитокинов, липидов в крови, гистологической картины в атеросклеротических бляшках различных типов при поражении внутренней сонной артерии. **Материал и методы исследования.** Работа основана на результатах обследования и лечения 130 больных, которые были разделены две группы: со стабильными (73 пациента) и нестабильными (57 пациентов) бляшками. **Результаты и их обсуждение.** При проведении параллелей между данными УЗДГ и клинической картиной, установлено, что наибольшую значимость имеют атеросклеротические бляшки около 3 мм и более, а также бляшки с изъязвлением. Деструкция атеросклеротической бляшки сопровождается более высокими уровнями провоспалительных цитокинов, таких как ФНО, ИЛ-6 и СРБ и противовоспалительного цитокина ИЛ-10. У всех пациентов, наблюдалось повышение показателей общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и триглицеридов. **Выводы.** Дестабилизация атеросклеротической бляшки сопровождается повышением концентрации ФНО $15,9 \pm 1,91$ пг/мл, ИЛ-6 $16,3 \pm 1,8$ пг/мл, ИЛ-10 $4,92 \pm 0,82$ пг/мл и СРБ $8,42 \pm 1,21$ пг/мл. Установлена сильная корреляционная связь между подтвержденным наличием у больного нестабильной атеросклеротической бляшки, данными УЗДГ и гистологического исследования. Таким образом, по концентрации цитокинов можно прогнозировать дестабилизацию атеросклеротической бляшки и применять соответствующие лечебные мероприятия направленные на профилактику ишемических осложнений (инсульт, инфаркт).

S07-35

РОЛЬ TGF В ПАТОГЕНЕЗЕ ТРОМБОЗА ВЕН СЕТЧАТКИ И АНТИАНГИОГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Иващенко А.С., Михайличенко В.Ю.

ГУ "Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины", Донецк, Украина

Нами было сформировано 2 группы по 62 пациента в каждой, 1 группа – контроль – проводили стандартную консервативную терапию тромбоза вен сетчатки; 2 группа – сравнения – помимо стандартной терапии пациентам вводили препарат Айлия (афлиберсепт) интравитреально по 2 мг в 0,05 мл. При исследовании плазмы крови, нами отмечено, что концентрация тканевого активатора плазминогена в норме составило $66,5 \pm 3,67$ нг/мл, а средняя концентрация tPA составила $12,13 \pm 8,59$ нг/мл, что свидетельствует о том, что выход из эндотелиальных клеток tPA приводит к повышению фибринолитического потенциала, активации плазминогена. Концентрация ингибитора тканевого активатора плазминогена в норме составило $9,78 \pm 2,31$ IU/мл и при ишемическом тромбозе вен повышался $18,99 \pm 4,42$ IU/мл. наиболее высокая активность PAI-I отмечена у пациентов с гиперхолестеринемией и повышенным содержанием гомоцистеина до $25,3 \pm 18,7$ мкмоль/л (при норме $6,5 \pm 5,4$ мкмоль/л). У больных с тромбозом вен сетчатки, поступивших на обследование в стационар в первую неделю уровень TGF α не изменялся, тогда как TGF β повышался в 10 и более раз. При возникновении посттромботической неоваскулярной глаукомы концентрация TGF α в слезной жидкости возрастала в 1,7, а TGF β – в 28 раз. TGF- β является одним из ключевых медиаторов образования фиброваскулярного рубца в исходе субретинального неоангиогенеза и его повышение является прогностически неблагоприятным фактором, по динамике которого можно ориентироваться об эффективности лечения. Применение ангиогенной терапии, а именно препараты группы VEGF-Trap, позволило значительно уменьшить концентрацию в слезной жидкости TGF α и TGF- β .

S07-36

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Айнур Акильжанова,^{1,2}

¹ Назарбаев университет, Центр наук о жизни, Астана, Казахстан; ² Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан

Данное исследование было разработано для изучения взаимодействия фенотипа гомоцистеина с генотипами MTHFR. Для оценки C677T и A1298C функциональных полиморфизмов в гене MTHFR и их ассоциации с риском рака молочной железы, а также эффектом плазматических уровней общего гомоцистеина на MTHFR-ассоциированный риск, нами проводилось исследование случай-контроль в казахской популяции женщин с раком молочной железы (n=315) и практически здоровых женщин без наличия онкозаболеваний в анамнезе (n=604).

Методы. Генотипирование полиморфизмов MTHFR проводилось с использованием TaqMan assay. Общий гомоцистеин в плазме крови определяли с помощью ВЭЖХ. Метаболический статус женщин оценивали определением биохимических показателей - уровней витамина B12, фолиевой кислоты, альбумина, креатинина и CRP в сыворотке крови. Статистический анализ был выполнен с использованием программы SPSS 19.0, Япония.

Результаты. MTHFR 677T аллельный вариант был связан с повышенным риском развития рака молочной железы [OR 1,71 (95% CI: 1.21-2.43) и 1.55 (95% CI: 1.11-2.16) по кодоминантной и доминирующей моделям, соответственно]. MTHFR 1298C аллельный вариант был связан со сниженным риском развития рака молочной железы [OR 0,68 (95% ДИ: 0.49-0.95), доминантная модель]. Значительно более низкие уровни альбумина и более высокие уровни креатинина и CRP были найдены у больных женщин, чем в контрольной группе, в то время как уровни витамина B12 были одинаковыми в обеих группах. В обеих группах отмечались низкие уровни фолиевой кислоты, значительно ниже у пациентов с раком молочной железы (2,8 нг / мл по сравнению с 2,9 нг / мл, p = 0,019). Уровни гомоцистеина были выше у больных раком по сравнению с контрольной группой (p = 0,001). Уровни плазмы гомоцистеина не были связаны либо с MTHFR C677T (p = 0,67) или A1298C (p = 0,36), но они были в обратной зависимости от статуса фолата пациентов (p < 0,0001). Дальнейший анализ распределения гомоцистеина у пациентов с разными генотипами MTHFR C677T в зависимости от уровня фолиевой кислоты (категории на основе верхней квартили значений, наблюдавшихся во всех набранных субъектов, т.е. 4 нг / мл), показали, что наиболее высокие уровни гомоцистеина были обнаружены у пациентов с генотипом TT и низким уровнем фолата, хотя различия не были значимыми (p = 2,39, p = 0,138). Многофакторный анализ показал, что фолат (p = 0,019) были независимым предиктором повышенного уровня гомоцистеина у пациентов с раком. Эти результаты свидетельствуют о важной роли метаболизма гомоцистеина в канцерогенезе. Низкие уровни фолиевой кислоты и генотип MTHFR C677T TT являются детерминантами гипергомоцистеинемии у больных раком молочной железы.

S07-37

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ALDH7A1 И РИСК ОСТЕОПОРОЗА У ЖЕНЩИН КАЗАХСТАНА

**Акильжанова А.Р.^{1,2}, Айтқұлова А.М.¹, Абилова Ж.М.², Жұматова З.С.³,
 Акильжанова Г.А.⁴**

¹*РГП «Национальный центр биотехнологии» г.Астана;* ²*АО «Назарбаев Университет» г.Астана;* ³*Городская поликлиника №1 г.Павлодар;* ⁴*Центр перинатологии, г. Павлодар*

Остеопороз (ОП) характеризуется прогрессивным снижением количества костного вещества в единице объема кости, приводя к повышенному риску патологических переломов. Ацетальдегиддегидрогеназа может ингибировать пролиферацию остеобластов и снижать формирование костной ткани. В связи с этим несомненный интерес представляет изучение ассоциации полиморфизма гена *ALDH7A1* с ОП среди женщин Казахстана.

Методы. В исследование были включены 419 женщин в возрасте 21-84 лет, проходивших обследование в поликлиниках г. Павлодара и клинике КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, г.Алматы. Всем участницам проведено определение минеральной плотности костей методом DEXA. Геномную ДНК выделяли из цельной крови наборами для выделения ДНК (Qiagen). Генотипирование полиморфизма rs13182402 гена *ALDH7A1* проводили с методом Real-time PCR с использованием специфических зондов TaqMan® SNP Genotyping Assay.

Результаты. По результатам МПКТ женщины были разделены на 2 группы: с низкой МПКТ (группа исследования, n= 153 остеопения и n=76 остеопороз) и нормальной МПКТ (группа контроля, n=190). Анализ данных генотипирования показал достоверную ассоциацию (OR=1.7, C.I.= [1.57-5.02], p=0.0004) с риском развития ОП среди женщин казашек, однако не выявлено достоверной ассоциации среди женщин других национальностей (OR=1.3, C.I.= [1.07-3.02], p=0.3). Частота мутантного генотипа AA была выше у женщин с низкой МПКТ по сравнению с женщинами с нормальной МПКТ во всех группах национальностей: казашек, русских и других – 37,5%, 29,2%, 27,3% соответственно. Таким образом, можно предположить, что *ALDH7A1* является потенциальным генетическим маркером, способствующим риску развитию ОП и низкой МПКТ среди женщин Казахстана.

В данном исследовании выявлена достоверная ассоциация полиморфизма rs13182402 гена *ALDH7A1* с остеопорозом у женщин казахской популяции. Частота рискованного генотипа AA данного полиморфизма была выше у женщин с низкой МПКТ.

Исследование полиморфизма гена *ALDH7A1* можно проводить для прогнозирования на генетическом уровне остеопороза, что позволит проводить у носителей мутаций стратификацию риска развития и профилактику остеопороза.

S07-38

ЧАСТОТА МУТАЦИЙ В ГЕНАХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ У КАЗАХСТАНСКИХ БОЛЬНЫХ ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ

**Айнур Акильжанова¹, Сауле Рахимова¹, Жаннур Абилова¹, Омирбек Нуралинов²,
 Гульжайна Рашбаева², Аян Абдрахманов², Махаббат Бекбосынова²**

¹*Назарбаев университет, Центр наук о жизни, Астана, Казахстан;* ²*Национальный научный кардиохирургический центр, Астана, Казахстан*

Фибрилляция предсердий (ФП) является наиболее распространенным видом аритмий, приводящей к значительной заболеваемости и смертности. Патогенез ФП остается не до конца изученным до настоящего времени. В последнее время все больше свидетельств того, что ФП является многофакторным заболеванием - результатом взаимодействия между факторами окружающей среды и генетическими. Показана роль генетических мутаций в генах сердечных калиевых каналов в патогенезе ФП.

Цель: изучить частоту мутаций в генах I (Ks) калиевых каналов KCNQ1, KCNE1 и KCNE2 у казахстанских пациентов с фибрилляцией предсердий.

Методы: Мы провели скрининг генетических вариантов генов калиевых каналов KCNQ1 (NM_000218.2), KCNE1 (NM_000219.2), и KCNE2 (NM_172201.1) у 69 пациентов с фибрилляцией предсердий и 27 родственников во всех белок-кодирующих экзонах с помощью двунаправленного секвенирования на ABI 3730xL ДНК Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Калифорния, США).

Результаты: В общей сложности, патогенные мутации были выявлены в 39 случаях из 69 (56,5%). Из них, мутации гена KCNQ1 составили 14,5%, тогда как мутации гена KCNE1 составили 43,5%, мутации гена KCNE2 - 1,4%. Большинство отдельных мутаций были обнаружены в одном случае (80%), в то время как 20% мутаций были обнаружены более чем один раз. Сиквентс альтерации в гене KCNQ1 экзона 13 (S546S G1638A) и экзона 16 (Y662Y, C1986T) выявлены у десяти пациентов (14,5%). В гене KCNE1 в экзоне 3 мутации, S59G A280G наблюдалась у 30 из 69 пациентов (43,5%) и KCNE2 экзон 2 T10K C29A у 1 больного (1,4%). Генетический скрининг клинически интактных 27 родственников выявил мутации у 26,9%, показывая, что они подвержены риску сердечных событий, таких как аритмии и риску внезапной сердечной смерти.

Заключение: В группе казахстанских больных с фибрилляцией предсердий, патологические мутации в генах калиевых каналов KCNQ1, KCNE1 и KCNE2 выявлены в 56,5% случаев. Более того скрининг мутаций в данных генах среди родственников выявил мутации в 26,9% случаев. Результаты данного исследования подтверждают необходимость генетического обследования больных с фибрилляцией предсердий и членов их семей на возможные мутации в генах, кодирующих сердечные ионные каналы для возможного выявления генетического риска, как аритмий, так и внезапной сердечной смерти. Необходимо проводить скрининг мутаций и в других генах, кодирующих ионные каналы сердца, чтобы определить частоту и распределение возможных патологических мутаций у казахстанских пациентов с фибрилляцией предсердий.

S07-39

DNA DAMAGE REPAIR CAPACITY AND CANCER TREATMENT

Boichuk S.

Kazan State Medical University, Department of Pathology.

DNA damage repair (DDR) mechanisms play an important role in anti-cancer drug resistance. For instance, platinum-based chemotherapeutic drugs induce DNA damage which trigger an apoptotic death of cancer cells due to the attenuated ability/failure of DDR mechanisms. However, tumor resistance to platinum-containing drugs might be due to the up-regulation of homologous recombination and nucleotide excision repair pathways in cancer cells which reverse DNA damage. Therefore, the up-regulated (over-activated) DDR pathways in cancer cells might be considered as a potential targets for selective inhibition which in turn increase efficacy of DNA damaging chemotherapy used in combination with such selective inhibitors. Alternatively, knowledge of the dysfunctional DDR helps to identify the chemotherapeutic DNA damaging drug, which induces DNA damage only repaired by the defective DNA repair pathway. Thus, in both cases, to make the standard chemotherapy more effective, it is important to identify an over-activated or down-regulated DDR mechanisms in cancer cells. For example, many cancers have high DNA methyltransferase (MGMT) levels, which normally repair an alkylated nucleotide, converting its back to guanine. Thus, cancers with high MGMT levels are resistant to alkylating agents and the inhibition of this DDR mechanism in such tumors is considered to prevent resistance and make such cancers more sensitive to standard chemotherapy with alkylating agents. Our current work indicates the novel role of PML protein as an tumor suppressor protein due to its ability to coordinate DDR mechanism and facilitate homology-directed repair following DNA double-strand break (DSBs) induction. We observed that PML protein was involved in processing of DSBs and focal accumulation of homology-directed repair proteins (Mre11, BRCA1, RPA) and can associate with Rad51 recombinase and required for its stability and focal accumulation in DNA damage areas. Given that Rad51 protein plays an important role in coordination of homologous-repair (HR) mechanism and taking into account that cancer cells harboring BRCA1/2 mutations are defective in HR which make them potentially sensitive to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors it might be important to investigate whether tumors with dysfunctional PML are sensitive to this treatment regimen. Thus, an efficiency of cancer chemotherapy often depends from an efficacy /failure of the DDR mechanisms in cancer cells. Moreover, the selective inhibition of DDR mechanisms used in combination with DNA damaging chemotherapy could significantly sensitize tumor cells and increase efficacy of cancer therapy.

S07-40

СТРАТЕГИИ ПОИСКА НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ РАКА ЖЕЛУДКА: СОБСТВЕННЫЙ ОПЫТ

Григорьева Е.С.^{1,2}, Волкоморов В.В.^{1,2}, Карбышев М.С.³, Степанов И.В.⁴, Завьялова М.В.^{1,4}, Чердынцева Н.В.^{1,2}, Краснов Г.С.⁵, Лисицын Н.А.⁶, Берестень С.Ф.⁶

¹ФГБУ "Томский НИИ онкологии", г. Томск; ²Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск; ³Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская обл., Петушинский р-н, п. Вольгинский; ⁴ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск; ⁵ФГБУ "Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта" РАН, г. Москва

Внедрение таких технологий, как масс-спектрометрия, анализ белковых и ДНК-микрочипов, в сочетании с современными представлениями функционирования генома, позволило одновременно анализировать тысячи генов и белков, что привело к возобновлению интереса к поиску новых биомаркеров рака.

Поиск новых более информативных маркеров рака желудка (РЖ) является актуальной задачей современной медицины. Нами был апробирован оригинальный подход к поиску новых потенциальных маркеров РЖ. Для формирования панели кандидатных маркеров было использовано два дополняющих друг друга метода. Был использован метод сравнения белковых профилей нормальной и опухолевой ткани больных РЖ, с последующим выявлением белков с измененной экспрессией в опухоли, а также биоинформатический метод, заключающийся в анализе экспрессии различных мРНК в нормальных и опухолевых тканях по базам данных и отборе транскриптов с повышенной экспрессией в опухоли. Для валидации потенциальных маркеров мы оценили уровень транскрипции в парных образцах опухолевой и нормальной ткани, полученных от больных РЖ, методом количественной ОТ-ПЦР. Как наиболее перспективные, были выбраны три мишени – альдокеторедуктаза AKR1B10, иммунофилин PPIA и трансмембранный белок RMEP1. Для установления клинической значимости идентифицированных маркеров было проведено анализ их экспрессии в препаратах гистологических срезов тканей больных РЖ с известными отдаленными результатами лечения с использованием полученных нами поли- и моноклональных антител. Проведенное иммуногистохимическое исследование показало, что белки AKR1B10 и PPIA являются эффективными дополнительными критериями прогноза клинического течения РЖ. Снижение экспрессии PPIA в опухолевых клетках сопряжено с возникновением отдаленных метастазов у больных РЖ диффузного типа, а снижение экспрессии AKR1B10 по мере прорастания опухоли в стенку желудка является благоприятным признаком и связано со снижением риска метастазирования. Белок RMEP1 может быть использован в качестве маркера для дифференциальной диагностики РЖ, так как его экспрессия в эпителиальной ткани желудка исчезает в процессе нарастания диспластических изменений и злокачественной трансформации эпителия. Таким образом, разработанный алгоритм поиска позволил идентифицировать три новых маркера, ассоциированных с РЖ и, в дальнейшем может быть применен для выявления маркеров опухолей других локализаций.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (08-04-13705-офи_ц, 09-04-99072-р_офи), МНТЦ (#3909), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (№ 02.740.11.0769 от 12.04.2010).

S07-41

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА С677Т ГЕНА MTFHR С ОЖИРЕНИЕМ У ДЕТЕЙ

Егорова Э.С.¹, Шакирова А.², Лутфуллин И.Я.², Ахметов И.И.^{1,3}

¹*Казанский государственный медицинский университет, Казань;* ²*Казанская государственная медицинская академия, Казань;* ³*Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Казань*

Известно, что ожирение является мультифакторным заболеванием, на развитие которого большое влияние оказывают как средовое воздействие, так и генетические факторы. В последние годы было обнаружено, что помимо генетических факторов, существуют эпигенетические механизмы, которые задействованы в процессах, приводящих к развитию ожирения (Feinberg et al., 2010). Эпигенетические изменения связаны с процессом метилирования ДНК посредством ДНК-метилтрансфераз, которые присоединяют метильную группу к 5'-углероду цитозина. Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTFHR) катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата до 5-метилтетрагидрофолата, являясь активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и далее - S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК. Полиморфизм С677Т гена MTFHR приводит к снижению активности фермента, что предположительно влияет на статус метилирования ДНК. Целью данного исследования явилось определение ассоциации полиморфизма С677Т гена MTFHR с ожирением. В исследовании приняли участие 146 школьников г. Казани от 7 до 17 лет (12,9±2,5 лет). Полиморфизм С677Т гена MTFHR определяли методом ПЦР-ПДРФ. Антропометрические показатели определяли с помощью измерения обхватов тела и калиперометрии. В результате проведенного анализа выявлено, что частота Т аллеля полиморфизма С677Т MTFHR в группе лиц с ожирением или избыточной массой тела составила 46,6%, что значительно выше, чем в группе лиц с нормальным индексом массы тела (ИМТ) (22,5%, P=0.0017) и в группе лиц с недостаточным ИМТ (7,7%, P=0.0035). Корреляционный анализ показал положительную взаимосвязь Т аллеля с окружностью грудной клетки, бедер, бедра, толщиной кожной складки под лопаткой, под бицепсом, под трицепсом, в иллиакальной области, суммарной толщиной кожной складки и жировой массой тела, а также тенденцию к ассоциации Т аллеля с окружностью живота и плеча. Известно, что замена цитозина на тимин в 677 положении гена MTFHR приводит к термоллабильности фермента и снижению его активности на 30% (Sharp and Little, 2004), что вероятно способствует гипометилированию и активации некоторых генов, участвующих в регуляции жирового обмена. Таким образом, полиморфизм гена MTFHR ассоциируется с ожирением у детей школьного возраста.

S07-42

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА ЛЕГКОГО В ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК КРОВИ

**К.Ю. Капицкая¹, Т.Л. Ажикина¹, А.А. Пономарева², Н.В. Чердынцева², В.В. Власов³,
 П.П.Лактионов³, Е.Ю. Рыкова³**

¹ *ИБХ РАН, Москва, Россия;* ² *Томский НИИ онкологии, Томск, Россия;* ³ *ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия*

Изменение профиля метилирования геномной ДНК является одним из наиболее распространенных событий канцерогенеза. Анализ аберрантно метилированных фрагментов ДНК, циркулирующих в крови, (цирДНК) является привлекательным для диагностики, однако его применение осложняется низкой концентрацией молекул ДНК, невысоким содержанием опухоле-специфичных ДНК относительно ДНК здоровых клеток, и небольшим размером фрагментов. Для оценки статуса метилирования маркеров в цирДНК обычно применяются методы, основанные на бисульфитной конверсии ДНК, что приводит к ее деградации и снижению чувствительности. Мы использовали новый подход, основанный на селекции гиперметилированных фрагментов цирДНК при помощи ДНК-метил-связывающего белка (Methylated CpG Island Recovery Assay, MIRA). Поведен сравнительный анализ индекса метилирования (ИМ) гена опухолевой супрессии RARβ2 и ретротранспозона семейства L1 в цирДНК крови больных немелкоклеточным раком легкого (n=15) и здоровых доноров (n=15). ЦирДНК из плазмы и скп-цирДНК выделяли с использованием наборов (БиоСилика, Россия). Для анализа выбраны фрагменты 5'-нетранслируемых областей гена опухолевой супрессии RARβ2 и ретротранспозона семейства L1H1 человека. Методом ПЦР в режиме реального времени определяли количество фрагментов в препаратах ДНК до и после обогащения методом MIRA, вычисляли индекс метилирования (ИМ). Выявлена тенденция увеличения уровня метилирования ИМ гена RARβ2 и снижения уровня метилирования фрагмента ретротранспозона L1 в цирДНК плазмы и скп-цирДНК крови (критерий Манна-Уитни, p<0,1). Анализ уровня метилирования фрагмента L1 подсемейства L1Hs, специфичного для человека, выявил статистически значимое снижение в цирДНК у больных HNPCL относительно здоровых доноров (критерий Манна-Уитни, p < 0,06). В работе показано, что гипометилированные многокопийные повторы могут быть более эффективными маркерами рака относительно однокопийных генов. Результаты говорят о перспективности применения метода MIRA для создания простых, технологичных и эффективных методов анализа метилированных маркеров, пригодных для мониторинга рака легкого.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014 г.

S07-43

БЫСТРЫЙ ПРОТОЧНЫЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*: КОРРЕКТНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Г.В.Черепнев^{1,2}, Г.Р. Иггисамова², Л.И. Зайнуллин², Н.В. Калачева², А.А. Ризванов²

¹ ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Казань; ² Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Митохондриальная дисфункция играет существенную роль при сердечно-сосудистых болезнях, сахарном диабете, септическом шоке, онкологических и нейродегенеративных заболеваниях, однако лабораторная оценка биоэнергетических ответов клеток пациентов затруднительна [Kramer P.A et al., 2014. doi: 10.3791/51301]. В сфере трансляционных клинических исследований митохондрий предложена новая концепция “Биоэнергетического индекса здоровья”, вычисление которого может быть полезно для уточнения патофизиологических механизмов болезни, определения тяжести и темпов ее прогрессии, а также для развития новых терапевтических подходов [Chacko V.K. et al., 2014. doi: 10.1042/CS20140101]. Ключевая идея концепции – использование митохондрии в качестве “шахтерской канарейки” (‘canary in the coal mine’), заранее предвещающей биоэнергетический кризис. Сходство структур митохондриального комплекса I (NADH:убихинон оксидоредуктаза, E.C. 1.6.5.3) млекопитающих и строгих аэробов дрожжей *Yarrowia lipolytica* позволяет использовать *Yarrowia lipolytica* в качестве модели для изучения митохондриальных дисфункций человека [Drose S. et al., 2011. e1001128; Nicaud J.M., 2012. doi: 10.1002/yea.2921]. Нами впервые разработан быстрый метод анализа индивидуальных митохондриальных ответов клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica* на основе технологии проточной цитометрии и потенциал-чувствительного рациометрического флуорохрома JC-1. Предлагаемая модель имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет определять трансмембранный митохондриальный потенциал в неразрушенных клетках (без выделения митохондрий), имеет внутренний положительный контроль (разбавитель окислительного фосфорилирования CCCP), и обеспечивает нормированные измерения трансмембранного митохондриального потенциала с учетом гетерогенности клеточных размеров и числа митохондрий в отдельной клетке. Гомология митохондриального комплекса I млекопитающих и *Yarrowia lipolytica* открывает перспективы использования данной модели для поиска модификаторов биоэнергетических ответов клеток человека.

S07-44

ROLE OF TLR2, TLR8, IFN AND IL1B POLYMORPHISMS IN SUSCEPTIBILITY TO PULMONARY TUBERCULOSIS IN KAZAKHSTANI POPULATION

D.Yerezhpov, M.Zhabagin, A.Askapuli, S.Rakhimova, Zh.Nurkina, A.Abilmazhinova, A.Akhmetova, A.Molkenov, U.Kairov, A.Akilzhanova

Департамент геномной и персонализированной медицины, Центр Наук о Жизни, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

Background: Tuberculosis (TB) is multifactorial disease, including environmental, social, microbial and genetic factors, which all contribute to the clinical picture. TB cases in Kazakhstan have risen from late 1990s till 2004. After, number of cases slightly decreased, but multidrug-resistant (MDR) TB cases are dramatically increased. Now Kazakhstan is one of the 27 countries burdened by MDR TB. It is known that up to one third of world population are infected by Mycobacterium tuberculosis (MTB) and only 1% of them will develop any form of active tuberculosis. Polymorphisms in genes involved in human immune response to infections have been associated with TB susceptibility in many populations. In our study we investigated genetic variants of genes involved in immune response to MTB infection in order to find association with risk of developing pulmonary TB (PTB) among population of Kazakhstan.

Methods: In our case-control study we recruited 703 participants from 3 regions of Kazakhstan. Of which, 251 patients with pulmonary TB (PTB) and 452 healthy controls (HC) 298 of which were males and 409 females. 474 of all participants were Kazakhs, 160 Russians, 24 Ukrainians and rests were represented by other nationalities. Medical and environmental data collected by questionnaires from participants by interviewing. DNA isolated from whole blood. Genotyping executed by TaqMan assay on 4 polymorphisms: IFN γ (rs2430561) and IL1 β (rs16944), TLR2 (rs5743708) and TLR8 (rs3764880). Statistical data analyzed by SPSS 19.

Results: We found no significant difference in the polymorphism genotypes frequencies among PTB and control groups ($p>0.05$). TLR8 polymorphism showed a significant difference in grouping by gender. Genotype A/G was significantly higher in females (41.5% in females vs. 1.3% in males) and G/G in males (49% in males vs. 20.7% in females) ($\chi^2=161.43$, $p<0.001$), which indicates that heterozygous genotype may increase the susceptibility to TB in females and homozygous A/A in both. Analysis by ethnicity showed that genotype T/T of IFN γ gene ($\chi^2=20.27$, $p<0.001$) and genotype G/G of TLR8 gene ($\chi^2=28.64$, $p<0.001$) was prevalent in Asians, in both case and control groups.

Conclusion: Results could not provide significant association with susceptibility to PTB possibly due to heterogeneous background of our study groups. Further investigations are needed to clarify whether these polymorphisms have a strong impact to TB in Kazakhstani population.

S07-45

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 274 АЛЛЕЛЬНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Искакова А.Н.^{1,2,3}, Сихаева Н.С.^{1,3}, Айткулова А.М.^{1,3}, Романова А.А.^{1,3}, Жолдыбаева Е.В.^{1,3}, Раманкулов Е.М.¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Астана, Казахстан; ²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан; ³ТОО «General Genetics», Астана, Казахстан

Введение. На сегодняшний день проблема подбора правильной дозировки лекарственных средств является крайне актуальной для всех стран. В базе данных РГП «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» в период с января по декабрь 2013 года имеется 1784 карт-сообщений о побочных действиях лекарственных средств, выявленных на территории РК. Из них, на лекарственные препараты отечественных производителей – 635, зарубежного производства – 846 карт-сообщений.

Цель. Изучение распределения аллелей и генотипов 274 однонуклеотидных полиморфизмов, отвечающих за чувствительность к основным фармакологическим группам лекарственных препаратов, определяющих особенности липидного, углеводного и белкового метаболизма, ассоциирующих с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Материалы и методы. В работу была включена популяционная выборка из 875 людей казахской национальности. Из них 499 – здоровые люди, 277 – образцы ДНК пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС), 99 – образцы ДНК пациентов, страдающих ИБС на фоне развития рестеноза. Генотипирование проводилось с использованием фармакогеномных слайдов PGx по технологии OpenArray согласно протоколу производителя. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Haploview 4.2

Результаты: Были определены частоты встречаемости 274 аллельных вариантов генов. С целью проведения анализа на неравновесие по сцеплению все аллельные варианты генов были распределены по хромосомам. В данном тезисе представлены данные по анализу 10-ой хромосомы.

Соответствие равновесию Харди-Вайнберга: 27 однонуклеотидных полиморфизмов – не встречаются (MAF =0); 5 однонуклеотидных полиморфизмов не соответствуют равновесию Харди-Вайнберга, 8 однонуклеотидных полиморфизмов соответствуют ($p > 0.05$), (MAF от 0.003 до 0.466).

LD: неравновесие по сцеплению по аллельным полиморфизмам rs17885098 и rs1057910 ($D' = 0.89$, $LOD = 13.96$, $r^2 = 0.519$), rs1799853 и rs10509681 ($D' = 0.859$, $LOD = 13.91$, $r^2 = 0.647$), rs1799853 и rs11572080 ($D' = 0.858$, $LOD = 13.88$, $r^2 = 0.647$), rs10509681 и rs11572080 ($D' = 1$, $LOD = 22.64$, $r^2 = 1$), rs1717620 и rs2273697 ($D' = 1$, $LOD = 2.35$, $r^2 = 0.05$), rs1717620 и rs3740066 ($D' = 1$, $LOD = 31.14$, $r^2 = 0.543$), rs2273697 и rs3740066 ($D' = 0.841$, $LOD = 2.24$, $r^2 = 0.065$).

S07-46

ПЕРВЫЕ ПОЛНЫЕ ГЕНОМЫ КАЗАХОВ: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Каиров У.Е.¹, Рахимова С.Е.¹, Молкенов А.Б.¹, Arang Rhie², Jong-Il Kim², Jeong-sun Seo², Жумадилов Ж.Ш.¹ и Акильжанова А.Р.¹

¹*Департамент геномной и персонализированной медицины, Центр Наук о Жизни, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан;* ²*Институт Геномной Медицины ILSCHUN, Сеулский Национальный Университет, Корея.*

Секвенирование нового поколения представляет собой мощный инструмент для генетического анализа и позволяет нам раскрыть ассоциацию локусов в определенных местах генома с фенотипом и особенностями заболеваний. Секвенирование геномов будет лежать в основе биологии и медицины человека, обеспечивая генетической информацией из единого референсного источника. Существенные технические достижения и снижение стоимости секвенирования ДНК, сделало секвенирование полных геномов доступным тестом на многочисленные индикаторы. Международный проект «Генетическая архитектура казахского населения» направлен на определение полной последовательности ДНК казахстанских лиц.

Методы. Полногеномное секвенирование проводили на шести индивидуумах казахской популяции с использованием платформы секвенирования нового поколения HiSeq2000, Illumina и применением набора реактивов TruSeq SBS Kit v3. Все сгенерированные *.bcl файлы были преобразованы и демультимплексированы с помощью bcl2fasta. Выравнивание секвенсовых ридов выполнялось с использованием BWA-mem на основе референсного генома b19. Сортировка, удаление промежуточных файлов, сборка *.bam файлов, маркировка дубликатов были выполнены с помощью пакета PicardTools. GATK haplotype caller был использован для поиска вариантов. Для выявления клинических геномных вариантов у индивидуумов казахской популяции применялись базы ClinVar, SNPedia и Cosmic. Для выполнения обработки данных и запуска программных скриптов были установлены Java Runtime Environment и пакеты R Bioconductor.

Результаты. Были завершены процедуры выравнивания и картирования ридов на референсный геном hg19 каждого из шести здоровых лиц казахской популяции. Секвенировано от 87,308,581,400 до 107,526,741,301 пар оснований со средним покрытием 29,85. От 98.85 до 99.58% пар оснований были полностью картированы с со средней точностью 96,07%. Показатели Het/Hom и Ti/Tv для каждого полного генома колебались от 1,35 до 1,52 и от 2,07 до 2,08, соответственно. Мы сравнили и проанализировали каждый геном с существующими клиническими базами ClinVar, SNPedia, Cosmic и обнаружили от 20 до 25, от 269 до 288, от 7 до 12 записей, соответственно. Наличие референсной геномной базы данных индивидуумов казахской популяции является основой для дальнейшего изучения природы изменчивости последовательностей, предрасположенностей к возможным заболеваниям и фенотипическим особенностям.

Заключение. Впервые проведено полногеномное секвенирование индивидуумов казахской популяции. Мы обнаружили полиморфизмы, связанные с различными предрасположенностями. Необходимо дальнейшее изучение полных геномов казахского населения для выявления возможных уникальных генетических вариантов.

S07-47

АНАЛИЗ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ GRM3 И GAD2 С РАЗВИТИЕМ ШИЗОФРЕНИИ У РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

К.О. Киняшева¹, А.Э. Гареева¹, Э. К. Хуснутдинова¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, г. Уфа*

Шизофрения - это тяжелое многофакторное психическое заболевание с высоким коэффициентом наследования (ок. 80%) и приблизительно одинаковой распространенностью во всем мире (ок. 1% населения). Нарушение функционирования глутаматергической системы, а также дефицит ингибирования, связанный с нарушением работы ГАМК-ергической нейротрансмиттерной системы, считаются одними из важнейших компонентов этиопатогенеза шизофрении. Из литературных данных известны ассоциации полиморфных вариантов гена метаболитного рецептора глутамата третьего типа GRM3 (7q21.1 - q21.2) и гена ГАМК-декарбоксилазы GAD2 (10p11.23) с развитием шизофрении.

Цель данного исследования - изучение роли трех полиморфных локусов rs274622, rs187993, rs6465084 гена GRM3 и двух полиморфных локусов rs2236418, rs928197 гена GAD2 в развитии шизофрении в этнических группах русских и татар из Республики Башкортостан. Выборка состояла из 338 больных (50% русских и 50% татар) и 350 здоровых индивидов (50% русских и 50% татар).

В результате проведенного исследования выявлены маркеры повышенного риска развития шизофрении – это генотипы GRM3 *G / *G (OR = 2,16; P = 0,043) локуса rs187993 гена GRM3 в русской этнической группе и GRM3 *A / *A (OR = 3,69; P = 0,00003) и аллель GRM3 *A (OR = 2,55 ; P = 0,0003) полиморфного локуса rs6465084 гена GRM3 у лиц татарской этнической принадлежности. Анализ неравновесия по сцеплению показал наличие умеренного сцепления между двумя локусами rs274622 и rs187993 гена GRM3 (D' = 0,51) в русской этнической группе. При анализе распределения частот гаплотипов между изученными группами лиц с шизофренией и контролем достоверные различия не выявлены.

При изучении полиморфных локусов гена GAD2 обнаружено, что генотип GAD2 *A/*A (OR=3,62; P=0,0009) и аллель GAD2 *A (OR=3,11; P=0,002) локуса rs2236418 являются рисковыми маркерами развития шизофрении у лиц татарской этнической группы. При анализе распределения частот гаплотипов, сконструированных на основе rs2236418, rs928197 гена GAD2, выявлен гаплотип AT, являющийся маркером повышенного риска развития шизофрении (OR=2,15; P=0,0001) у лиц татарской этнической принадлежности.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-97012p_поволжье_a).

S07-48

СПОЛИГОТИПИРОВАНИЕ КАЗАХСТАНСКИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *M.TUBERCULOSIS*

Жомамкулов У.А.^{1,2}, Ахметова А.Ж.¹, Linda Gebhardt², Vincent Escuyer², Акильжанова А.Р.¹

¹*Департамент геномной и персонализированной медицины, Центр Наук о жизни Назарбаев Университет, Астана, Казахстан;* ²*Wadsworth Center, New York State Department of Health, USA*

В Казахстане в 2013г. насчитывалось приблизительно 73,7 и 5,6 на 100тыс. населения случаев заболевания и смертности от ТБ соответственно, при этом, показатели лекарственно-устойчивого туберкулеза растут с каждым годом, особенно показатели туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. На данный момент во многих странах мира отмечается распространение штаммов *M.tuberculosis* семейства Beijing, ассоциированных с высоким риском распространения лекарственной устойчивости.

Целью исследования является оценка распространенности различных семейств методом сполитогипирования среди клинических изолятов *M.tuberculosis*, выделенных на территории Казахстана.

Проведение гибридизации ПЦР фрагментов на мембрану и дальнейший анализ осуществлялся по разработанному протоколу в микобактериологической лаборатории Wadsworth center (штат Нью-Йорк, США). Структура DR-региона методом сполитогипирования была определена для 143 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом из различных регионов Казахстана. Для каждого штамма был получен гибридизационный паттерн, образующийся в результате взаимодействия уникальных зондов, иммобилизованных на нейлоновой мембране, с фрагментами DR-региона каждого из исследованных штаммов. Сравнительный анализ полученных данных с данными интернациональной базы SpolDB3, SpolDB4, SITVITweb разделил исследованную выборку на 36 генотипов, входящих в состав 7 генетических семейств. Десять обнаруженных в нашей выборке генотипов в базе данных микобактериологической лаборатории Wadsworth center (штат Нью-Йорк, США) не представлены, но обнаружены в базах данных SpolDB3, SpolDB4 и SITVITweb. 27 (18.8%) клинических изолятов имели уникальные сполитогипаттерны. Наибольший кластер был образован штаммами, относящимися к семейству Beijing 85 (59.4%). Меньше штаммов входило в состав четырех следующих по величине семейств – T, Haarlem, LAM и MANU – 22 (15.3%), 20(13.9%), 11 (7.6%) и 3 (2.0%) штаммов, соответственно. По одному штамму представлены лишь в двух семействах CAS (0.6%) и X3 (0.6%).

Результаты генотипирования штаммов *M.tuberculosis*, методом сполитогипирования показал преобладание штаммов семейства Beijing (59.4%) среди казахстанских клинических изолятов *M.tuberculosis*.

S07-49

НОВЫЕ МАРКЕРЫ РАКА ЛЕГКОГО: АБЕРРАНТНО-МЕТИЛИРОВАННЫЕ LINE-1 ПОВТОРЫ В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК КРОВИ

Пономарева А.А.^{1,4}, Рыкова Е.Ю.², Н.В. Чердынцева^{1,3}, А.А. Бондарь², А.Ю. Добродеев¹,
 А.А. Завьялов¹, С.А. Тузинов¹, Т.И. Меркулова⁵, В.В. Власов², П.П. Лактионов²

¹Томский НИИ онкологии, Томск, Россия; ²ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия; ³ТГУ, Томск, Россия; ⁴ТПУ, Томск, Россия; ⁵ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

Основными компонентами aberrантного метилирования ДНК клеток опухоли являются гиперметилирование промоторов некоторых генов и гипометилирование значительной части ДНК, в частности, повторяющихся последовательностей ретротранспозонов. В опухолевой ткани при раке легкого (РЛ) выявлено гипометилирование ретротранспозонов семейства LINE-1. Известно, что при онкологических заболеваниях в составе циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухоле-специфичных aberrантно метилированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами. В настоящей работе был проведен сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 повторов в цирДНК крови 21 больного РЛ до лечения и 23 здоровых доноров. Кровь разделяли на плазму и клетки, фракцию скп-цирДНК получали последовательной обработкой клеток фосфатным буфером и раствором трипсина. Для выделения цирДНК использовали наборы «Биосилика» (Новосибирск). Концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 района 1 (LINE met) определяли методом количественной метил-специфичной ПЦР с использованием TaqMan зонда. Для нормирования данных по метилированию оценивали концентрацию всех фрагментов LINE-1 района 2 (LINE Ind) методом количественной ПЦР с красителем EvaGreen. Выявлена тенденция снижения концентрации метилированных фрагментов LINE met (в 1,4 раза) в связанной с клетками фракции цирДНК крови у больных НМРЛ (критерий Манна-Уитни, $p=0,16$). Оказалось, что в группе больных РЛ концентрация всех фрагментов LINE Ind, которая не зависит от статуса метилирования, ниже в 3 раза (при аденокарциноме в 4 раза) относительно здоровых доноров. Поэтому в скп-цирДНК крови при РЛ вместе с ожидаемым снижением общей концентрации LINE met выявлено неожиданное увеличение их относительной концентрации (LINE met/LINE Ind) за счет значительного снижения общего количества LINE Ind. В цирДНК плазмы индекс метилирования (LINE met/LINE Ind) у больных РЛ не отличается от здоровых доноров (критерий Манна-Уитни $p=0,40$). Полученные результаты подтверждают наши более ранние данные о том, что фракция скп-цирДНК является высокоинформативным источником материала для диагностики рака легкого.

Работа поддержана проектом Президиума СО РАН совместно со сторонними организациями № 65 (2012-2014 гг.).

S07-50

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПЕЧЕНИ И ТЕСТИКУЛАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВЫСОКИХ ДОЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА.

Козловская Г.В., Косырева А.М., Мхитаров В.А., Васильева С.Г.

ФГБУ Научно-исследовательский институт Морфологии человека РАМН.

Целью работы было сравнительное изучение морфологических изменений и экспрессии генов провоспалительных цитокинов в результате воздействия высоких доз липополисахарида.

В опыте использовали 2 группы по 12 половозрелых самцов крыс Вистар. Опытной группе самцов вводили внутрибрюшинно ЛПС *E. coli* штамм O26:B6 в дозе 1,5 мг/кг, контрольной группе вводили физиологический раствор. Введение проводили с 9.00 до 10.00 утра (г. Москва). Для определения уровня экспрессии генов цитокинов животных выводили из опыта через 3 часа после введения ЛПС. Для выявления морфологических проявлений синдрома системного воспаления в печени и семенниках животных выводили из эксперимента на 1-е сутки после введения ЛПС. Гистологические срезы печени и семенников окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки морфофункционального состояния семенников применяли морфологические и морфометрические критерии: диаметр извитых семенных канальцев, площадь ядер клеток Лейдига и индекс сперматогенеза. Уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИФН- γ определяли методом количественной ПЦР на амплификаторе RotorGene6000 в присутствии SYBR Green. Использовали референсный ген глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Анализ данных, полученных на Rotor Gene 6000, осуществляли методом 2-delta-delta Ct. Нормальность распределения данных и статистическую значимость различий оценивали с помощью программы Statistica 7.0. Использовали t-критерий Стьюдента, непараметрический критерий Манна-Уитни и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. На 1-е сутки после введения ЛПС в печени у самцов крыс Вистар наблюдались выраженные альтеративные изменения: выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов, очаговые некрозы, неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, в их просвете определялись зернистые скопления и нити фибрина, стазы и сладжи. Однако в тестикулах крыс на 1-е сутки после введения ЛПС воспалительных изменений не выявлено. Индексы сперматогенеза опытной и контрольной групп животных не различались. Статистически значимо увеличивалась площадь ядер клеток Лейдига, что, видимо, вызвано компенсаторным усилением функциональной активности клеток Лейдига. Анализ уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов показал, что по сравнению с контрольной группой, через 3 часа после введения высокой дозы ЛПС и в печени и в семенниках наблюдалось увеличение уровня транскрипции ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИФН γ . По сравнению с семенниками экспрессия всех исследованных цитокинов была статистически выше в печени.

S07-51

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА НА СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА

Козловская Г.В., Козловский Ю.Е.

ФГБУ Научно-исследовательский институт Морфологии человека РАМН.

Изучали взаимодействие пробиотика на основе *E. coli* с нормофлорой и иммунной системой самцов крыс линии *Sprague Dawley* при его однократном пероральном введении в дозе 10^8 клеток. Количественный и качественный анализ состава микрофлоры кишечника и экспрессии генов провоспалительных цитокинов проводили методом количественной ПЦР на амплификаторе *Rotor Gene 6000* в присутствии *SYBR Green*. Показано, что через 3 часа после введения пробиотика наблюдалось увеличение количества *E. coli* по сравнению с исходным на 1,5 порядка, которое и сохранялось на этом уровне, по крайней мере, до 8 часов и возвращалось к исходному уровню через 24 часа. Количество *Bifidobacterium spp.* практически не изменялось. Также наблюдалось, что введение пробиотика через 6 часов приводило к увеличению количества *Clostridium XIV* кластера на 2 порядка, а через 24 часа их количество приближалось к исходным значениям. Количество *Bacteroides* возрастало на 1,5-2 порядка к восьмому часу и к 24 часам возвращалось к норме. Количество энтеробактерий возрастало на 2 порядка к 8 часам и нормализовалось к 24 часам. Экспрессия гена TNF α в ткани печени незначительно возрастала в первые часы после введения пробиотика и через сутки возвращалась к исходным значениям. Изменения экспрессии гена IL12 тканями тонкого кишечника не обнаружено.

S07-52**BIOMARKERS IN THE STUDY OF THE OLDER RUSSIAN POPULATION****Dmitry A. Jdanov and Vladimir M. Shkolnikov*****Max Planck Institute for Demographic Research, Rostock, Germany***

Life expectancy in Russia is the lowest among industrialized countries. The mortality pattern is characterized by relatively low child mortality but high midlife and old-age mortality from cardiovascular and external causes. Despite recent positive changes the gap in old age mortality between Russia and most of other industrialized countries has decreased only marginally. At the same time, Russia has large socioeconomic differences in health and mortality. The reasons for this exceptional profile are not clear. What physiological phenomena could explain the mortality excess? Are adult Russians too fat or too weak? Do they have higher prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, hyperglycemia, inflammation, and other biomarkers of cardiovascular risk? Do they smoke and drink too much, are they too depressed or stressed?

We have investigated these issues in two population-based Russian surveys : (1) the study on Stress, Aging and Health in Russia (SAHR) and (2) the Study on global AGEing and health (SAGE, Russia). The western comparator data come from the English Longitudinal Study on Aging (ELSA) and the European Study on Health, Aging and RETirement (SHARE).

The Russia-West comparisons reveal a higher prevalence of dangerous levels for a number of biomarkers, characteristics of physical performance, and ill-health among older Russians. Analyses of the SAHR data show links between social disparities and biomarkers. It appears that biological risk significantly mediates social disparities in health and that respective effects are substantially stronger than those reported in other countries. In spite of these findings, the huge excess in the Russian cardiovascular mortality cannot be explained only by traditional epidemiological risk factors. In particular, Russians have quite favorable lipid profile.

Russia has an unusual shape of cardiovascular mortality. It differs from classical atherosclerosis pattern and experiences large fluctuations. Probably some part of these can be attributed to alcohol. The new International Project on Cardiovascular Disease in Russia aims to investigate this and other underlying physiological mechanisms of cardiovascular death.

S07-53**PEPTIDOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH GUILLAIN-BARRE SYNDROME****O.M. Ivanova, R.H. Ziganshin, G.P. Arapidi, I.V. Azarkin, S.I. Kovalchuk, V.M. Govorun*****IBCh RAS, Moscow***

Gullian-Barre syndrome (GBS), or acute autoimmune inflammatory polyradiculoneuropathy, is a rare but one of the most serious illnesses of peripheral nervous system. It is defined as a paralytic, demyelinating disorder, characterized by massive lymphocytic infiltration and damaging of myelin sheath of peripheral nerves. GBS is a monophasic, self-limiting disease, which is characterized by full rehabilitation of patients in most cases. Two major subtypes of GBS, which differ from each other by clinical manifestations and, to all appearance, have different pathogenesis are known: acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AIDP) and acute motor axonal neuropathy. According to the data of a number of studies various virus or bacterial infections precede considerable part of GBS cases. Campylobacter jejuni, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and Mycoplasma pneumoniae are among the most often occurring infectious agents, which could trigger GBS. There are some suggestions about recruitment of molecular mimicry mechanisms and cytokine stimulation in pathogenesis of GBS. Campylobacter jejuni is regarded as the most probable trigger of axonal forms of GBS. Pathogenesis of the most prevailing form of GBS – AIDP, is mostly unknown until now.

Although GBS involves peripheral nerves only, this disease also known to be accompanied by increase in protein concentration in cerebrospinal fluid (CSF). But little is known about the protein and peptide composition of CSF during GBS progression until now. To identify the change in CSF proteome and peptidome composition which are associated with GBS, we compared CSF samples from 13 GBS patients and 20 patients with non-neurological diseases (Control).

The proteome analysis of CSF samples of both groups revealed 1541 proteins, and 491 of them were specific for GBS samples. As a result of peptidome analysis, 2562 peptides representing 773 proteins were identified in CSF samples. 1873 peptides derived from 591 proteins were specific for GBS samples.

Mapping of lists of proteins which were identified in the course of proteome and peptidome studies of CSF on KEGG and GO pathway databases revealed clusters of the interacting proteins which may be associated with pathogenesis of GBS.

S07-54

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ У РАБОТНИКОВ СИБИРСКОГО ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Д.С. Исубакова¹, Н.В. Литвяков², М.В. Халюзова¹, Е.Н. Альбах¹, Е.В. Брониовская¹,
 А.Э. Сазонов³, А.Б. Карпов¹, Р.М. Тахауов¹

¹Северский биофизический научный центр ФМБА России, Северск, Россия; ²Томский НИИ онкологии, Томск, Россия; ³Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Хромосомные и генные мутации, появляющиеся в различных клетках-мишенях, являются характерным эффектом действия ионизирующих излучений. Работники Сибирского химического комбината (СХК), в процессе профессиональной деятельности, подвергаются внешнему, внутреннему и сочетанному (внешнему и внутреннему) хроническому радиационному воздействию. Проведено исследование цитогенетических аномалий лимфоцитов крови 657 здоровых работников СХК, в зависимости от возраста, пола, вида облучения и дозы внешнего облучения.

Гендерных и возрастных различий в частоте хромосомных aberrаций (ХА) не установлено. Показано, что для индукции ХА, определяющим фактором является хроническое внешнее гамма излучение. При дополнительной радиационной нагрузке, за счет инкорпорированного ²³⁹Pu, в крови работников с сочетанным облучением по сравнению с работниками, подвергавшимися только внешнему облучению (при равных дозовых нагрузках по внешнему облучению), уменьшается частота ХА.

Дозовая зависимость индукции ХА у работников СХК от внешнего радиационного воздействия имеет нелинейный характер. При облучении в дозе >0-10 мЗв наблюдается статистически значимое уменьшение частоты aberrантных клеток, aberrаций хроматидного и хромосомного типов по сравнению с контролем, что соответствует явлению радиационного гормезиса. При хроническом радиационном воздействии в дозах менее 40 мЗв не отмечается значимого повышения частоты ХА, что может свидетельствовать в пользу известной пороговой модели. Начиная с диапазона доз >40-100 мЗв (для дицентриков с диапазона >100-200 мЗв), отмечается статистически значимое увеличение выхода ХА. В диапазоне доз от 100 до 500 мЗв на дозовой зависимости имеется плато, уровень цитогенетических аномалий не увеличивается и только возрастает статистическая значимость различий с контролем. Предполагается, что образование плато на дозовой кривой обусловлено активностью систем репарации и апоптоза.

После 500 мЗв частота ХА линейно возрастает с дозой внешнего облучения. По редким цитогенетическим аномалиям (хроматидные обмены, транслокации, полиплоиды) установлено, что статистически значимо более высокий уровень дозы внешнего облучения наблюдается у носителей, имеющих в лимфоцитах крови транслокации и хроматидные обмены.

S08-01

ПРИМЕНЕНИЕ БАЙЕСОВСКИХ СЕТЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРОВ АССОЦИИРОВАННЫХ С ФАКТОРАМИ РИСКА РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА

А.В.Сулимов¹, И.А.Савкин¹, А.Н.Мешков², С.А. Бойцов², В.Б.Сулимов¹

¹ООО «Димонта», Москва, Россия, ²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Данная работа посвящена повышению эффективности персонализированного прогноза развития атеросклероза и исследованию возможности выявления ключевых прогностических генетических факторов. Для этого применяется технология байесовских сетей (БС): построение сетей, их обучение и оценка качества предсказания с помощью обученных БС. Исследовалась возможность повышения качества предсказания путем оптимизации байесовских сетей по числу узлов, а также выявления новых прогностических факторов.

В основе данной работы лежит анализ клинико-генетической базы данных пациентов полученной в результате «Московского исследования Западного округа» в рамках которого проводилось обследование пациентов с разной величиной сердечно-сосудистого риска, рассчитанного по шкале (SCORE), в том числе генотипирование пациентов на микроматрицах Cardio-Metabochip (Illumina). Исходные данные содержали клиническую и генетическую информацию о 1200 пациентах. Генетические данные содержали информацию о 196725 SNP для каждого пациента. Валидация БС осуществлялась методом ROC-кривых. Оценка качества предсказания определялась значением площади под ROC-кривой (AUC).

Мы проводили поиск генетических маркеров ассоциированных с тремя факторами риска развития атеросклероза: уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), уровень липопротеина (а), уровень окисленных ЛПНП. Каждому фактору риска (ФР) в базе данных соответствовал свой собственный прогнозируемый параметр или конечная точка (КТ). Для каждого фактора риска из основной базы данных пациентов была сформирована своя база данных и соответствующая ей БС с наивной топологией и с КТ в корневом узле. Из-за сильного шума вызванного использованием в начальных базах более чем 190 000 параметров-узлов для каждого пациента предсказание не выявило никаких закономерностей (AUC \approx 0.5). Для повышения качества предсказания с помощью методов полногеномного поиска ассоциаций и критерия согласия Пирсона общее количество параметров-узлов было уменьшено до нескольких тысяч. Это привело к улучшению предсказания для всех ФР (AUC \approx 0.7-0.9). Далее БС оптимизировались по числу узлов, и целевой функцией в этой оптимизации была величина AUC – из БС параметры-узлы отбрасывались по одному, и в качестве исходной для следующего шага выбиралась сеть с наибольшей величиной AUC [1]. С помощью такой оптимизации число параметров-узлов было уменьшено на порядок, а величина AUC еще немного увеличена для каждого ФР.

Расчеты были проведены на персональных рабочих станциях и суперкомпьютерах МГУ имени М.В.Ломоносова: СКИФ МГУ «Чебышев» и Ломоносов.

1.Evgeny D. Maslennikov, Alexey V. Sulimov, Igor A. Savkin, Marina A. Evdokimova, Dmitry A. Zateyshchikov, Valery V. Nosikov& Vladimir B. Sulimov An intuitive risk factors search algorithm: usage of the Bayesian network technique in personalized medicine // Journal of Applied Statistics, 2014, DOI:10.1080/02664763.2014.934664

S08-02**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ****Н.В.Литвяков, М.М.Цыганов, Е.М.Слонимская, Н.В.Чердынцева***Лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, лаборатория онковирусологии и отделение общей онкологии Томского НИИ онкологии, Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск, Россия.*

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, обусловленная работой энергозависимых АВС-транспортеров (ATP-BindingCassette), является главной причиной неэффективности химиотерапии опухолей. Цель: в клинических условиях исследовать механизмы регуляции экспрессии генов АВС в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии (НАХТ).

Материалы и методы: Обследовано 145 больных раком молочной железы (IIa-IIIc стадиями), получавших НАХТ. Экспрессию 9 основных генов АВС определяли методом qRT-PCR в биопсийном материале до лечения и операционном материале после НАХТ каждого пациента. В ДНК опухоли до лечения при помощи метилчувствительной ПЦР изучено метилирование промоторов генов АВС. ДНК до лечения и после НАХТ была исследована на микроматрице фирмы Affymetrix (USA), CytoScan™ HD Array. Определяли структурные хромосомные аномалии в опухоли, число и изменение мутантных опухолевых клонов в процессе НАХТ и их связь с экспрессией генов АВС и эффектом НАХТ.

Результаты: Ранее нами было установлена связь снижения экспрессии АВС-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ с ее эффективностью [Litviakov N.V. et al., 2013]. Уровень метилирования промоторных областей генов АВС коррелирует с исходным уровнем экспрессии этих генов в опухоли молочной железы, но не оказывает существенного влияния на регуляцию экспрессии АВС-транспортеров в процессе НАХТ и формирование адаптивной МЛУ. С помощью микроматричных исследований показано, что у 95 % пациентов со снижением экспрессии генов АВС в процессе НАХТ в опухолевых клетках наблюдается высокая частота делеций и амплификаций, которые, по-видимому, нарушают физиологические механизмы ур-регуляции экспрессии генов АВС в ответ на химиопрепараты. Показано, что к таким нарушениям относятся делеции локусов самих генов АВС-транспортеров (3q27, 4q22.1, 6p21.32, 7q21.1, 10q24, 11q13.2, 16p11.2, 16p13.1, 21q22.3), амплификации 1q23.3, 1q32.2, 1q44 и делеции 11q22.3, 13q14.2. Наличие этих нарушений также связано с хорошим ответом на НАХТ и высокой 5-ти летней безметастатической выживаемостью. Определение наличия в опухоли до лечения этих маркеров может быть использовано в качестве предикторов хорошего ответа опухоли на НАХТ для персонализированного ее назначения.

S08-03

ГЕНОМОС: НОВАЯ СИСТЕМА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭКСПРЕССИИ ВСЕГО ГЕНОМА

Карлос Кораль-Гомес

Консультант по биоинформатике, Бостон, США

Много приложений геномики в персонализированной медицине и биотехнологии требуют знания уровней генетической экспрессии с большой точностью. "Геномос"¹- это компьютерная система для мониторинга, анализа и прогнозирования генетической экспрессии всего генома. Она основана на новом представлении экспрессии: это динамическое состояние, которое не подвергается непосредственному наблюдению, а оценивается исходя из ошибочных и неполных повторных измерений транскриптома. В нем, регуляция генетической экспрессии описывается аналитически, с помощью линейной динамической системы. В разреженном спектральном пространстве, система "Геномос" применяет метод последовательных оценок Байеса, чтобы обновить вероятности состояния генетических экспрессии рекурсивно, достигая высокую точность оценок состояния экспрессии после небольшого числа последовательных измерений транскриптома.

S08-04**ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ФОРМ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ**

Лебедев И.Н.¹, Кашеварова А.А.¹, Скрыбин Н.Н.², Салюкова О.А.¹, Четечкина Н.Н.¹, Назаренко Л.П.¹, Мензоров А.Г.³, Матвеева Н.М.³, Серов О.Л.³

¹ФГБУ "Научно-исследовательский институт медицинской генетики" СО РАМН, г. Томск, Россия, ²Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия, ³ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Проводимые в последние годы исследования демонстрируют неуклонный рост списка генов, мутации в которых зарегистрированы у пациентов с интеллектуальными нарушениями. Однако частоты таких мутаций, как правило, оказываются чрезвычайно низкими, а их патогенетическая значимость остается неясной. Все это диктует необходимость внедрения современных геномных технологий для изучения и диагностики недифференцированных форм умственной отсталости. Кроме того, встает вопрос о разработке стратегии анализа фенотипических эффектов выявляемых мутаций на молекулярном и клеточном уровне. Решение данного вопроса может быть найдено с получением пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с их последующей дифференцировкой в нейрональном направлении, что обеспечит персонализированную диагностику, а в перспективе и возможную персонализированную терапию интеллектуальных нарушений.

Обследовано 80 пациентов с недифференцированной умственной отсталостью. Диагностика хромосомных aberrаций была проведена с помощью array-CGH на микрочипах HumanGenomeCGHMicroarray 44K или 60K (AgilentTechnologies). Верификация результатов диагностики, а также анализ родительского происхождения мутаций были выполнены с помощью Real-time PCR.

Сбалансированный хромосомный набор подтвержден для 44% пациентов. 28% обследованных имели в кариотипе нейтральные полиморфные варианты (CNV), а у 8 % выявлены микроделеционные синдромы, диагностика которых только на основании клинической картины не представляется возможной. Наконец, еще у 20 % пациентов зарегистрированы не описанные ранее хромосомные микроделеции или микродупликации, затрагивающие гены, нарушение функций которых может влиять на развитие и функционирование головного мозга. Одним из таких генов оказался ген *CNTN6*, продукт которого вовлечен в формирование межаксонных взаимодействий. От двух пациентов с микроделециями и микродупликациями данного гена получены линии ИПСК с целью изучения патогенетических эффектов мутаций *CNTN6* в нервной системе.

Исследование поддержано грантами 7 Рамочной программы Европейского союза, проект «CHERISH» (№ 223692) в части array-CGH анализа, а также грантом Российского научного фонда (№ 14-15-00772) в части получения линий ИПСК.

S08-05

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ АНТИАГРЕГАНТНАЯ ТЕРАПИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, ЖИТЕЛЕЙ СИБИРСКОГО РЕГИОНА РОССИИ

Лифшиц Г.И., Апарцин К.А., Зеленская Е.М, Выбиванцева А.В., Филипенко М.Л., Воронина Е.Н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Иркутский научный центр, Иркутск, Россия

Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Цель: проверка гипотезы о том, что высокая частота встречаемости полиморфного варианта цитохрома CYP2C19*2 ассоциирована с тромбозом коронарного стента, а также с парадоксальным лабораторным ответом на прием клопидогрела.

Материалы и методы: исследована выборка пациентов, поступающих по экстренным показаниям для стентирования коронарных сосудов (СКС) по поводу острого коронарного синдрома (ОКС). Пациенты получили нагрузочную дозу клопидогрела и продолжали лечение в поддерживающей дозе. Пациенты проходят 4 визита для оценки конечных точек эффективности и безопасности. Пациенты стратифицированы по носительству аллеля CYP2C19*2 и определению показателя резистентности (ПР), установленной при поступлении в стационар и через 48 ± 6 ч после СКС путем определения агрегации тромбоцитов с АДФ турбодиметрическим методом.

Предварительные результаты. На данный момент ПР при терапии клопидогрелом определен для 80 пациентов. Среди них у 16,25% пациентов встречается парадоксальная реакция (ПР<0), у 1,25% сниженный ответ на лечение клопидогрелом (0%<ПР<10%), у 10% пациентов отмечается промежуточный ответ (10%<ПР<30%), у остальных 72,5% наблюдался достаточный ответ на антиагрегантную терапию (ПР>30%).

Анализ 27 образцов крови выявил следующую частоту встречаемости полиморфизмов в аллеле CYP2C19*2: гомозиготный вариант составил 0%, гетерозиготный вариант – 22,2%, и дикий тип по данному аллелю – 77,8%.

Опрос 85 пациентов и их родственников выявил 1 случай летального исхода от установленного ретромбоза стента, 1 случай летального исхода от геморрагического инсульта, 3 случая расценены как вероятный ретромбоз стента.

Заключение. На основании результатов исследования можно говорить более частой встречаемости парадоксальной реакции на прием клопидогрела среди пациентов Сибирского региона, чем в мировой практике (16,2% против 2,5%). Распространенность гетерозиготных аллелей CYP2C19*2 составляет 22,2%. Серьезные нежелательные явления, связанные с приемом клопидогрела, наблюдались у 5% пациентов.

Работа выполняется при поддержке интеграционного проекта Президиума СО РАН 91 и Госконтракта 14.607.21.066.

S08-06**NGS В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Коваленко С. П.¹, Петренко Л.А.², Хафизов К.Ф.², Глазова О.В.², Касьянов А.С.², Кудрявцев А.¹, Назаренко Л.П.³, Слободянюк С.Я.⁴

¹НИИ молекулярной биологии и биофизики, г.Новосибирск, ²МФТИ, г.Долгопрудный, Московская обл., ³НИИ медицинской генетики, г.Томск, ⁴ООО "Биолинк", г.Новосибирск

Совместная разработка МФТИ, НИИ медицинской генетики (г. Томск), НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск), ООО "Биолинк" (г. Новосибирск) ориентирована на создание диагностической системы с использованием массового параллельного секвенирования на платформе IonTorrent, позволяющей анализировать однонуклеотидные полиморфизмы, связь которых с наследственными патологиями не вызывает сомнений.

Выделены 60 моногенных наследственных заболеваний, однозначно обусловленных однонуклеотидными полиморфизмами или небольшими инсерциями - делециями. База данных из 1688 мутаций, связанных с этими заболеваниями реализована с использованием MySQL. Для получения таргетной ПЦР-библиотеки из 427 фрагментов ДНК, необходимых для анализа этих мутаций, синтезированы соответствующие праймеры. Для присоединения адапторных последовательностей ДНК и последовательностей - идентификаторов образцов ("бар-кодов") разработана собственная ферментативная система, позволяющая получать фрагменты ДНК, содержащие необходимые служебные последовательности. Испытания системы анализа продемонстрировали возможность выявления мутаций, связанных с муковисцидозом, болезнью Помпе и болезнью Гоше. В целом система может быть использована для экономичного анализа наиболее значимых мутаций в геноме человека в ходе единственного исследования.

S08-07

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ИНТРОНОВ ГЕНА Т-КАДГЕРИНА (CDH13) С ХАРАКТЕРОМ МАНИФЕСТАЦИИ ИБС

Чотчаева Фатима Расуловна

*Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины
 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Известно, что в развитии ИБС существенную роль играют генетически обусловленные вариации активности белков, вовлеченных в патогенез атеросклероза и его осложнений. Т-кадгерин – рецептор адипонектина, опосредующий эффекты адипонектина на сердечно-сосудистую систему. Таким образом, полиморфизм гена CDH13 может приводить к развитию сердечно-сосудистой патологии.

Целью настоящего исследования является поиск ассоциации полиморфизма интронов гена CDH13 с формой манифестации ИБС.

Материалы и методы: в данной работе было обследовано 187 мужчин в возрасте от 26 до 55 лет, из них у 79 (42,3%) человек была диагностирована стабильная стенокардия (СС), а у 108 (57,7%) человек – ИМ без предшествовавших признаков стенокардии. Критериями включения являлись клинически и инструментально подтвержденные диагнозы ИБС при возрасте развития ИБС меньше 55 лет, критериями исключения – нарушение толерантности к глюкозе, сахарный диабет. Для определения генотипа проводилась ПЦР в реальном времени.

Результаты исследования: не было выявлено зависимости между формой манифестации ИБС и носительством полиморфизмов гена CDH13 rs4783244 ($p=0,83$), rs11646213 ($p=0,39$), rs12444338 ($p=0,49$). Между группами пациентов с ИМ и СС статистически значимые различия были получены для полиморфизма rs12051272 (G→T) гена CDH13: частота G-аллели в группе пациентов с ИМ оказалась больше (ОШ=6,37 (1,78-22,74), $p=0,001$), для генотипа GG выявлен наибольший риск развития ИМ ($p=0,004$, ОШ=6,89 (1,89-25,11)). Для полиморфизма rs12051272 были обнаружены статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов между выборками пациентов с ИМ и СС в группах пациентов с АГ ($p=0,009$; для GG-генотипа ОШ=8,12 (1,71-38,51)), без ожирения ($p=0,003$; для GG-генотипа ОШ=8,45 (1,74-40,96)), курящих ($p=0,02$; для генотипа GG ОШ=7,0 (1,36-35,93)), без гиперхолестеринемии ($p=0,009$; для генотипа GG ОШ=6,33 (1,68-23,94)).

Заключение: из приведённых выше данных следует, что в российской популяции носители аллели G rs12051272 гена CDH13, особенно в гомозиготной форме, имеют существенно больший риск развития ИМ без предшествующего коронарного анамнеза.

S08-08**СИСТЕМА АВО КАК КРИТЕРИЙ ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ**

Ф.Н. Гильмиярова¹, Е.А. Шахнович¹, В.М. Радомская¹, О.А. Гусякова¹,
Е.А. Рыскина², И.В. Горбачева¹

*ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России,
кафедра фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой*

ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», кафедра биохимии

В литературе представлены разрозненные, несистематизированные сведения о предрасположенности к определенным соматическим и инфекционным заболеваниям лиц с различной АВО-групповой принадлежностью крови. Молекулярная сущность этих явлений недостаточно аргументирована, поэтому создание теоретической базы данных о функциональной специфике антигенов системы АВО будет основой для выяснения причин индивидуальной реакции на экзогенные и эндогенные факторы обладателей различных групп крови, что имеет важное значение для развития превентивной медицины.

Цель: выяснить молекулярную основу белок-белкового взаимодействия на модели АВО системы.

В качестве модели для изучения белок-белкового взаимодействия нами использована антиген-антителная система группы крови АВО, а флаволигнан содержащий препарат силистронг в качестве фактора биоондирования. Установлено, что преимущественной мишенью для силистронга является гликопротеин А. Препарат замедляет узнавание и взаимодействие антигена с антителом, удлиняет время наступления агглютинации. Для гликопротеина В этот эффект не характерен. Моноклональные анти-А и анти-В антитела модифицируются силистронгом, что увеличивает время белок-белкового взаимодействия с соответствующими антигенами. Установлены группоспецифические отличия реакции системы А(II) группы крови на воздействие силистронга: удлинение времени наступления агглютинации с гликопротеином А(II) группы крови и снижение степени агглютинации естественных анти-В антител, инертность системы В(III) группы крови - гликопротеина В и анти-А антител.

Результаты использования проточной цитофлуориметрии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для качественной и количественной оценки антиген-антителных комплексов системы АВО показали, что наибольшее влияние силистронг оказал на взаимодействие гликопротеина А с анти-А антителами, мечеными флуоресцеинизотиоционатом, тогда как количество антиген-антителных комплексов, образованных гликопротеином В и моноклональными анти-В антителами, мечеными флуоресцеинизотиоционатом, осталось неизменным.

Установлены особенности белок-белкового взаимодействия у лиц А(II) и В(III) групп крови, выявлены молекулярные механизмы, лежащие в основе способности лиц со А(II) группой крови активно взаимодействовать с ксенобиотиками и патогенами.

S08-09

ЗАВИСИМОСТЬ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ СД2Т ПРЕПАРАТАМИ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ ОТ E23K (KCNJ11) И S1369A (ABCC8)

Пьянкова О.В.¹, Соколова Е.А.², Шабельникова О.Ю.³, Бондарь И.А.³, Филипенко М.Л.²

¹НГУ, Новосибирск, Россия, ²ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, ³НГМУ, Новосибирск, Россия

Препараты сульфонилмочевина (СМ) - препараты «первой линии терапии» при сахарном диабете 2-го типа. По способу связывания с КАТР каналом их можно разделить на группы, связывающиеся с А сайтом и АВ сайтом. Полиморфный локус S1369A гена *ABCC8* лежит рядом с сайтом А, а E23K гена *KCNJ11* приходится на сайт В, следовательно, они могут изменять ответ на терапию препаратами СМ.

Целью работы является исследование роли полиморфных локусов S1369A (*ABCC8*), E23K (*KCNJ11*) в эффективности сахароснижающей терапии СМ, связывающимися с А сайтом и АВ сайтами у пациентов с СД2Т, жителей Новосибирской области.

Частоты встречаемости генотипов для всех исследуемых полиморфных локусов соответствовали закону Харди-Вайнберга: для E23K $p=0.57$; для A1369Sp $=0.99$. Для установления влияния замен на успех терапии СМ пациентов делили на две группы: хороший ответ и вторичная резистентность к СМ, с последующим регрессионным анализом связи типа ответа с гаплотипом, так как данные локусы находятся в неравновесии по сцеплению ($r^2=0.56$, $D'=0.77$). В группу препаратов СМ, связывающихся с АВ сайтом вошло 87 пациентов со вторичной резистентностью к СМ и 12 с хорошим ответом. Не было обнаружено значимой ассоциации между гаплотипами E23K/S1369A и хорошим ответом на терапию СМ (23K/S1369:OR[95% C.I.]=2.27 [0.37-13.78] $p=0.37$; E23/S1369A: OR[95% C.I.]=2.10 [0.52-8.52] $p=0.30$; 23K/S1369A: OR[95% C.I.]=2.51 [0.85-7.46] $p=0.10$). В группу препаратов, связывающихся с А сайтом вошел 61 пациент со вторичной резистентностью и 9 с хорошим ответом. Однако среди пациентов группы с хорошим ответом были только носители генотипов EE/SS и KK/AA, в связи с чем провести анализ гаплотипов было невозможно.

В 2009 году Hammingetal. с помощью функциональных исследований показали, что замена 23K/S1369A приводит к повышенной чувствительности К⁺ АТФ зависимого канала к препаратам СМ группы А, но не группы АВ. По результатам нашего исследования ответ на СМ группы АВ не зависит от гаплотипа E23K/S1369A пациента. Исследование является пилотным в РФ и мире и существенным ограничением его является размер групп. Целесообразно дальнейшее продолжением работы на жителях других стран и регионов РФ.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ для фундаментальных исследований 13-04-00520.

S08-10**ACCELERATED DISCOVERY OF NEW TREATMENTS FOR PANCREATIC CANCER****Natalia Beglyarova¹, Vladimir Khazak¹, Igor Astsaturov²****¹Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA, ²Kazan Federal University, Kazan, Russia/Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA**

Pancreatic cancer (PCa) is 4th leading cause of cancer death in developed countries. Named as a “silent killer” it has no clear symptoms neither at the early stage nor the late. Detection at advanced stage, tendency to spread quickly and resistance to chemotherapy make prognosis extremely poor with only 5% survival rates at 5 years. An improvement in PCa treatment represents an urgent medical goal. Currently available models to test active compounds in vitro are limited to keep most of their original tumor specificity due to long time cell lines cultivation.

In our laboratory, we have established a procedure for rapid derivation of personalized PCa tumor grafts (PDX) and cell lines that highly represent cancer in patients. We have implanted PDX and derived cell lines from 40 PCa surgical samples, 35 from the primary tumor and 7 from metastatic lesions.

Using 5 genetically characterized patient-derived cell lines, we screened 850 clinical grade or FDA-approved agents for high anti-tumor activity based on standard viability assay. Top hits (mostly transcriptional inhibitors) were further validated in vivo in PDX models. Triptolide, an ERCC3 inhibitor extracted from the *Tripterygium wilfordii*, exhibited dramatic activity against MYC-amplified PDX tumors with complete remissions for several weeks. In contrast, treatment of pancreatic PDX with a wide range of clinically available compounds produced only temporary growth delays. We demonstrated that inactivation of ERCC3, a subunit of the TFIIH basal transcription factor, with triptolide or siRNA rapidly depletes MYC in PDAC cells (<2 hrs). Triptolide was particularly effective in depleting MYC in cancer cells with MYC gene amplification, while phosphorylated forms of MYC relatively resisted triptolide. Conversely, we show that ERCC3 expression is MYC-induced. This suggests interdependence of ERCC3 and MYC in cancer, and that pharmacological blockade of ERCC3 can be a highly effective strategy against PCa, and in tumors with MYC-amplification.

Our results suggest that the PDX models and patient-derived cell lines are useful for testing novel compounds in PCa and discover effective treatments for “undruggable” PCa. MYC gene copy number can be used as a biomarker of sensitivity to triptolide, or other ERCC3 inhibitors.

S08-11

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РЕСТЕНОЗА В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Е.В. Жолдыбаева¹, А.М. Айтқұлова¹, П.В. Тарлыков¹, О.А Вистерничан², Д.Ж.Тайжанова²

¹РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г.Астана, Казахстан, ²РГП

«Карагандинский государственный медицинский университет», Караганда, Казахстан.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из основных причин ранней инвалидизации и смертности трудоспособного населения во всех развитых странах мира. В 2011 году в Казахстане было зарегистрировано 51974 новых случаев ИБС. Широко распространенным и довольно эффективным способом лечения ИБС является коронарное стентирование. Однако стентирование не обладает абсолютной эффективностью, и в 20-35% случаев после стентирования могут возникать рестенозы (повторное сужение сосудов). Исследования проводили по типу «случай-контроль». В исследуемую группу были включены пациенты с диагнозом ишемическая болезнь сердца (ИБС), у которых развился рестеноз после стентирования коронарных артерий. Контрольную группу составили пациенты с диагнозом ИБС, у которых не развился рестеноз в течение 6 месяцев после стентирования. Проводилось генотипирование 60 SNP, используя ПЦР в режиме реального времени. Для статистической обработки результатов генотипирования использовали пакет программ PLINKv1.07. Статистически значимая ассоциация с риском развития рестеноза выявлена в полиморфизме гена FGB (rs1800790) (OR – 3.281, P-value – 0.001246); в полиморфизме гена THBD (rs1042579) (OR – 1.807, P-value – 0.04944); в полиморфизме гена KAT2B (rs2929404) (OR - 1.844, P-value - 0.02444). Вышеописанные генетические маркеры могут быть прогностическими в оценке риска развития рестеноза в казахской популяции.

S08-12**ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ПРИ ЭПИЛЕПСИИ****Беленикин М.С.¹, Брюханова Н.О.¹, Мутовин Г.Р.², Жилина С.С.¹****¹ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, Москва, Россия, ²ФГБУ НПЦ мед.помощи детям ДЗМ, Москва, Россия**

Эпилепсия - одно из наиболее распространенных и социально значимых заболеваний нервной системы, которому подвержены около 1% населения. Причины возникновения заболевания самые разные, но наибольший интерес для генетических исследований представляют идиопатические формы эпилепсии.

Высокопроизводительное секвенирование представляет собой мощный и получающий все большее распространение инструмент для изучения наследственных заболеваний. Преимуществом, но одновременно и трудностью этого инструментария является генерация избыточного количества информации, которую нужно фильтровать и адекватно интерпретировать. Вовлеченность в патогенез эпилепсии большого числа генов, а также разнообразие эпилептических синдромов значительно усложняет такую интерпретацию. И даже диагностика моногенных форм эпилепсий сопряжена с рядом экспериментальных трудностей. В своей работе для исследования детских эпилепсий мы используем весь спектр молекулярно-генетических исследований, от ресеквенирования экзонов отдельных генов до полногеномных исследований. Эти данные мы комплексно анализируем с учетом результатов медицинских обследований пациентов. Полученные данные свидетельствуют о необходимости коррекции и дополнительной систематизации алгоритмов обследования пациентов, продолжении работы над систематизацией эпилептических состояний, а также наглядно демонстрируют, что в случае сложно наследуемых мультифакторных заболеваний биоинформационную обработку и интерпретацию полученных результатов следует проводить с большой осторожностью, придавая клиническим проявлениям первоочередное значение.

S08-13

ВРОЖДЕННАЯ СТРУКТУРНАЯ МИОПАТИЯ. КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Беленикин М.С.¹, Баринов А.А.², Жилина С.С.¹, Шаталов П.А.³, Шарина М.Ю.¹, Брюханова Н.О.¹, Мещерякова Т.И.¹, Прокопьев Г.Г.¹, Демидова И.А.², Мутовин Г.Р.⁴

¹*ФГБУ НПЦ мед.помощи детям ДЗМ, Москва, Россия*, ²*ГАУЗ МГОб № 62 ДЗМ, Москва, Россия*, ³*НИКИ педиатрии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*, ⁴*ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, Москва, Россия*

Миопатии - наследственные или приобретенные нервно-мышечные заболевания. Существует множество форм миопатий, отличающихся возрастом дебюта заболевания, тяжестью течения и преимущественным поражением тех или иных групп мышц. Сложность диагностики миопатий обуславливается вариабельностью симптомов, а также сложностью подтверждающей диагностики.

В работе представлены результаты обследования пациентки 8 мес с врожденной миопатией и ранними дыхательными нарушениями. В ходе обследований были найдены незначительное повышение уровня сывороточной креатинкиназы, снижение амплитуды и полифазность потенциалов на ЭМГ, раннее формирование контрактур и кардиомиопатия. Течение заболевания пациентки манифестировало не только мышечной слабостью, но и ранними нарушениями дыхания, а по клинической картине и результатам гистологии мышц нам не удалось определиться с нозологической принадлежностью заболевания. Молекулярно-генетические исследования мы проводили с помощью панели генов TruSightExome (Illumina) и высокопроизводительного секвенирования. Учитывая клиническую картину заболевания и результаты секвенирования, нами был установлен клинический диагноз "Врожденная структурная проксимальная миопатия с ранними дыхательными нарушениями" (MIM:603689), что является аллельным вариантом миопатии Салиха.

S08-14**АЛГОРИТМ МЕДИЦИНСКОЙ АННОТАЦИИ ГЕНОМНЫХ ДАННЫХ****Эдуард Викторович Генерозов¹, Александр Владимирович Павленко², Владимир Александрович Наумов¹, Николай Александрович Кулемин¹****¹Лаборатория Молекулярной Генетики Человека НИИ ФХМ ФМБА РФ, Москва, Россия, ²Лаборатория Биоинформатики НИИ ФХМ ФМБА РФ, Москва, Россия**

В связи с развитием технологий секвенирования геномов и снижением цены, возрастает объем получаемых геномных данных. Как следствие, остро стоит задача совершенствования методов обработки и интерпретации полученных результатов. Большой объем накопленной информации по медицински значимым нуклеотидным вариациям в геноме человека позволяет вплотную приблизиться к решению задачи персонализации генетического прогноза для пациентов, которые располагают информацией о своем геноме.

Нами был разработан универсальный программный инструмент для индивидуальной, пациент-ориентированной аннотации результатов полногеномного/экзомного секвенирования или высокоплотного генотипирования на ДНК чипах. Аннотационная программа использует собственную базу данных, содержащую записи о более 150 000 клинически-значимых полиморфизмов, полученных из различных источников: GWAS исследования, SNPedia, OMIM, LOVD, pharmGKB и другие открытые базы данных. В качестве результата программа предоставляет структурированные по медицинским категориям заключения, содержащие как референсную информацию, позволяющую независимо оценить информативность выбранных маркеров, так и развернутые текстовые описания, которые могут быть понятны не специалистам. В настоящее время осуществляется проверка работы алгоритмов программы в сравнении с результатами, полученными при помощи альтернативных подходов для интерпретации генетических данных.

S08-15

ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ПРИ НАЗНАЧЕНИИ СТАТИНОВ.

Кох Наталья Викторовна¹, Лифшиц Галина Израилевна¹, Солдатов Галина Сергеевна², Воронина Елена Николаевна¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия, ²Поликлиническое отделение ЦКБ СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Статины – группа гиполипидемических средств, которые применяются для снижения прогрессирования атеросклероза. Наиболее часто обсуждаемыми НПР статинов являются миопатии. Риск статин-индуцированных миопатий (СИМ) складывается из многих факторов. В исследованиях GWA выявлена ассоциация полиморфизм rs4149056 гена SLCO1B1 с СИМ. Мы обследовали 130 пациентов, принимающих статины по медицинским показаниям не менее 6 месяцев. Класс и дозировка статина выбирались терапевтом индивидуально для каждого пациента. Жалобы на идиопатические мышечные боли предъявляли 18 (14%) человек (группа № 1), у 112 (86%) человек (группа №2) жалобы отсутствовали. Группы не отличались по возрастным и гендорным характеристикам, принимаемым препаратам. Всем пациентам проведено генотипирование локуса rs4149056. Частота встречаемости минорного аллеля «С» во всей выборке составила 16% (в группе №1 – 33%, в группе №2 -14%). Выявлена ассоциация минорного аллеля «С», полиморфного локуса rs4149056 Т>С гена SLCO1B1 с СИМ. Носительство минорного аллеля С повышает риск СИМ в 4,5 раза (Odds_ratio=4.5, C.I.=[1.6-12.7], chi2=9, p=0.0026). Фармакогенетическое тестирование перед приемом статинов, может быть применено для выявления пациентов с дополнительным фактором риска СИМ.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН «Фундаментальные науки – медицине» - 2012-2020

S08-16

СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ МИРНК ПОДАВЛЯЮТ АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННОГО ОСЛОЖНЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Шилковский И.П., Никонова А.А., Бабахин А.А., Шершакова Н.Н., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р.

ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России. Москва, Российская Федерация.

Введение. Респираторный синцитиальный вирус (RSV) усиливает аллергическое воспаление и гипер-реактивность бронхов (ГРБ) у пациентов с бронхиальной астмой (БА). Было показано, что высокий уровень IL-4 коррелирует с частотой RSV-индуцированных осложнений БА. В настоящее время отсутствуют эффективные способы лечения таких осложнений. Препараты, основанные на применении антител против RSV или IL-4, ограничены по причине высокой стоимости. Было показано, что феномен интерференции РНК позволяет подавлять экспрессию генов как вируса, так и организма-хозяина. Поэтому мы спроектировали молекулы миРНК как против IL-4 (siIL4), так и против гена, кодирующего фосфопротеин Р вируса RSV (siP) и изучили их на мышиной модели RSV-индуцированного осложнения БА.

Методы. Самки мышей линии BALB/c были сенсibilизированы тремя в.б. инъекциями 1 мг/кг овальбумина (OVA) в смеси с 100 мг/кг гидроксида алюминия в дни 0, 14, 21 и затем челленжированы 10 мг/мл раствором OVA 50 мкл/мышь интраназально (и.н.) в дни 35, 36, 37. Мыши были и.н. инфицированы вирусом в дозе 1×10^7 TCID₅₀/мышь за 24 ч перед первым челленжем. siIL4 была и.н. введена 48 ч и 5 ч перед первым челленжем и 5 ч перед вторым в суммарной дозе 5 мг/кг. siP в дозе 3,5 мг/кг была и.н. введена 3 ч перед инфекцией. Контрольные мыши получали такую же дозу неспецифических молекул миРНК. ГРБ оценивалась пневмотахографически 24 ч после челленжа. Гистологический анализ легких и клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) оценивался микроскопически 48 ч после челленжа. Экспрессия гена IL-4, и вирусная нагрузка в ткани легких была измерена методом RT-PCR.

Результаты. Инфильтрация эозинофилов в БАЛ у мышей, получавших siIL4 и siP была в четыре раза ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о снижении аллергического воспаления в легких. После введения siIL4 и siP происходило двукратное снижение ГРБ. Кроме того, в результате гистологической оценки ткани легких отмечено снижение числа перибронхиальных инфильтратов и эозинофильной инфильтрации. Экспрессия гена IL-4 в ткани легкого, оцениваемая методом RT-PCR была в три раза ниже у мышей, получавших специфические миРНК. Количество копий геномной РНК вируса RSV в ткани легких также заметно снижалось в 5,7 раза.

Заключение. Таким образом, мы спроектировали две молекулы миРНК, которые эффективно снижают аллергическое воспаление, ГРБ, и вирусную нагрузку в легких на мышиной модели вирус-индуцированного осложнения БА, что может быть многообещающим подходом для лечения данных осложнений.

S08-17

ИССЛЕДОВАНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ С АКТИВНОСТЬЮ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У СТУДЕНТОВ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ

А.В. Кьергаард³, О.С. Глов^{1,2,4}, В.С. Пакин^{1,2}, Л.В. Шадрин², М.М. Данилова^{2,4}, А.С. Глов^{1,2}

¹Федеральное бюджетное учреждение Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Российская Федерация; ²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Национальный государственный Университет физической культуры, спорта и здоровья имени П. Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург, Российская Федерация; ⁴ООО «БиоГлот», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Известно, что нарушения в функционировании антиоксидантной системы (АОС) могут приводить к сбоям в работе механизмов адаптации и развитию мультифакториальных заболеваний. АОС находится под контролем ферментов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), имеющей выраженный генетический полиморфизм.

Проведен комплексный мониторинг здоровья 189 студентов 1 курса СПбГУ мужского и женского пола (средний возраст 18,5±1,8 лет), постоянно проживающих в Северо-Западном регионе РФ. В ходе исследования определены концентрации ферментов АОС в плазме венозной крови и изучено методом ПЦР и гибридизации на ДНК-биочипах распределение полиморфных вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы: ренина (*REN*), ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*), ангиотензиногена (*AGT*), рецептора ангиотензина II 1-го типа (*AGTR1*) и рецептора ангиотензина II 2-го типа (*AGTR2*) в исследуемой выборке.

Анализ корреляции, проведенный с помощью точечно-бисериального коэффициента (*grb*), показал влияние аллельного полиморфизма генов *REN* (I9-83G>A), *ACE* (I/D) и *AGTR1* (1166A>C) на функциональную активность ряда наиболее важных ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы. Выявлено, что у гомозигот по G-аллелю гена *REN* снижена активность каталазы (*grb* = -0,25, P<0,05) и глутатионпероксидазы (*grb* = -0,26, P<0,05), тогда как у гетерозигот G/A – только глутатионпероксидазы (*grb* = -0,20, P<0,05). У гомозигот по I-аллелю гена *ACE* снижена активность супероксиддисмутазы (*grb* = -0,25, P<0,05). У гомозигот по C-аллелю гена *AGTR1* активность супероксиддисмутазы снижена (*grb* = -0,20, P<0,05), а у гетерозигот A/C она повышена (*grb* = 0,22, P<0,05).

Таким образом, было показано, что наличие ДНК-полиморфизма в структуре генов РАС вносит свой вклад в формирование уникальности каждого человека в отношении активности свободнорадикальных процессов, определяя его антиоксидантный статус и индивидуальный адаптационный потенциал.

S08-18

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ BCL-2 И MTOR В Т-ЛИМФОЦИТАХ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ АСТМЫ

С.Н. Абрамов, А.Р. Фатхуллина, Э.В. Романова, З.И. Абрамова

Казанский Федеральный Университет

Апоптоз считался единственной формой регулируемой гибели клеток, но проведенные исследования детального механизма апоптоза (Аро) показали, что существует еще одна форма программируемой клеточной гибели (ПКГ), а именно - аутофагия (Aut) (Mehrpour, 2010). Показано, что при длительном клеточном стрессе инициируется гибель клетки либо аутофагическим путем, либо по пути апоптоза (Edinger, 2004; Pua, 2007). Рооп и соавторы (2012) в проведенных исследованиях обнаружили аутофагосомы в фибробластах и эпителиальных клетках пациентов со средне-тяжелой формой астмы, указывая на связь между Aut и снижением функции легких у больных. С другой стороны, пролонгацию аллергического воспаления при астме связывают с усилением выживаемости Т-лимфоцитов (Т-Лф) и утратой ими способности к Аро. Однако, механизмы ПКГ, посредством, которого происходит переключение с одного процесса на другой, не до конца ясны (Rohn, 2011).

Целью исследования стала разработка возможной модели взаимосвязи Аро - Aut в норме и при развитии астмы на примере экспрессии генов антиапоптотического белка bcl-2 и антиаутофагического белка mTOR.

Анализ влияния дексаметазона (Dex), как индуктора Аро на экспрессию генов bcl-2 и mTOR в Т-Лф здоровых доноров показал, что под влиянием Dex происходит снижение экспрессии как гена bcl-2, так и mTOR. Однако характер влияния Dex на mTOR отличается от bcl-2. Если экспрессия гена bcl-2 в процессе длительного культивирования Т-Лф, испытывающих недостаток питательных веществ, то экспрессия mTOR-гена повышается (т.е. преобладает активация Аро). Оценка экспрессии исследуемых генов в Т-Лф пациентов с астмой (тяжелая форма) показала увеличение экспрессии белка bcl-2(подавления Аро) и снижение белка mTOR (активация аутофагии способствующая выживаемости Т-Лф).

Исходя из этого, можно говорить, что Dex у больных тяжелой формой заболевания активирует экспрессию bcl-2 в Т-Лф, чем способствует активации аутофагии, т.е. можно предположить, что Dex выступает как ингибитор экспрессии белка mTOR.

Полученные результаты позволяют говорить, что существует взаимосвязь и переключение одного процесса ПКГ на другой. В Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмы показана активация аутофагии, которая может способствовать длительному функционированию Т-Лф, персистенции заболевания и ее более тяжелым проявлениям на фоне доказанного факта выживаемости Т-Лф в связи с утратой ими способности к апоптозу что проявляется в замедлении процессов фрагментации ДНК Лф (Бойчук, Мустафин, 2010, Vignola, et al., 2000).

S09-01

WHEN WILL WE UNDERSTAND THE HUMAN GENOME? THE SEQUENCING HYPE, ITS REAL IMPACT FOR LIFE SCIENCE RESEARCH, CLINICAL MEDICINE, BIOTECH INDUSTRY AND ABOUT COMPUTATIONAL BIOLOGY IN BIOMOLECULAR MECHANISM DISCOVERY

Frank Eisenhaber

Executive Director - Bioinformatics Institute (BII), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR)

Despite dramatic technical progress in genome and transcriptome sequencing, the ability to link changes in human sequences with phenotypic outcomes is severely limited. After the enthusiastic era offirst full genome sequencing that started with a few bacteria and yeast in the middle of the nineties and culminated in the first human genome draft, the expectations with regards to cures of not yet treatable diseases or to new biotechnologies have not been fulfilled even nearly to the extent as the original hype might have promised. Whereas the impact is dramatic in cases where biomolecular mechanisms are known, little progress even over several decades in the future should be expected where this is not the case [1].

With existing sequencing technologies, it is difficult to sequence eukaryote genomes completely. In cooperation with IRRI Manila, we have shown that rice variety genomes can be reconstructed only to estimated ~80% of the reference genome length with Illumina data (~65% estimated error-free). Except for few cases of clear statistical links between certain genomic aberrations and phenotypic properties, genotypes can be linked to phenotypes only via the explanation level of biomolecular mechanisms the knowledge of which is currently fragmentary at best. It is most urgent to discover or augment function description for >10000 non- or poorly characterized human genes [1]. The key to understanding biomolecular sequences is via function prediction from protein sequences and the plethora of methods for structure and function prediction from protein sequence integrated in BII's ANNOTATOR environment [2] is reviewed. Examples of function discovery for transamidase subunit genes pig-T, Gpaal [3] and for ATGL as well as mutation interpretations for influenza [4-6] illustrate the point.

References

- 1) A decade after the first full human genome sequencing: when will we understand our own genome? Eisenhaber F. J Bioinform Comput Biol. 2012 Oct;10(5):1271001
- 2) Integrated tools for biomolecular sequence-based function prediction as exemplified by the ANNOTATOR software environment. Schneider G, Wildpaner M, Sirota FL, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Eisenhaber F. Methods Mol Biol. 2010;609:257-67
- 3) Transamidase subunit GAA1/GPAA1 is a M28 family metallo-peptide-synthetase that catalyzes the peptide bond formation between the substrate protein's omega-site and the GPI lipid anchor's phosphoethanolamine. Eisenhaber B, Eisenhaber S, Kwang TY, Gruber G, Eisenhaber F. Cell Cycle. 2014 Jun 15;13(12):1912-7
- 4) A new piece in the puzzle of the novel avian-origin influenza A(H7N9) virus. Lee RT, Gunalan V, Van TD, Le LT, Eisenhaber F, Maurer-Stroh S. Biol Direct. 2013 Oct 26;8:26. doi: 10.1186/1745-6150-8-26
- 5) Potential Human Adaptation Mutation of Influenza A(H5N1) Virus, Canada. Maurer-Stroh S, Li Y, Bastien N, Gunalan V, Lee RT, Eisenhaber F, Booth TF. Emerg Infect Dis. 2014 Sep;20(9):1580-2. doi:10.3201/eid2009.140240
- 6) The highly pathogenic H7N3 avian influenza strain from July 2012 in Mexico acquired an extended cleavage site through recombination with host 28S rRNA. Maurer-Stroh S, Lee RT, Gunalan V, Eisenhaber F. Virol J. 2013 May 1;10:139. doi: 10.1186/1743-422X-10-139

S09-02**FAMILY BASED APPROACH IN STRUCTURAL GENOMICS AND DRUG DISCOVERY****Natallia V. Strushkevich, Alexey V. Yantsevich, Anna V. Vasilevskaya, Tatyana V. Shkel, Sergey A. Usanov, Andrei A. Gilep*****Institute of Bioorganic Chemistry NASB, Minsk, Belarus***

Поиск эффективных лекарств связан с выбором мишени, модуляция работы которой позволяет остановить или ослабить патологический процесс. Молекулярные мишени действия лекарств относятся к разным семействам белков. В связи с этим наиболее эффективной стратегией поиска потенциальных лекарственных средств является комплексное структурно-функциональное исследование близкородственных белков с последующим *in silico* анализом.

Ферменты семейства цитохрома P450 катализируют реакции биосинтеза и деградации стероидных гормонов, простагландинов, лейкотриенов, желчных кислот, витаминов группы D3 и трансформации ксенобиотиков. Поиск модуляторов данных ферментов позволяет создавать лекарства направленные на лечение рака молочной железы, заболеваний предстательной железы, сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома. Кроме этого, P450 участвуют в метаболизме большинства лекарственных средств и, как следствие, являются фактором, обуславливающим персонализированный ответ на фармакотерапию.

Получение и использование данных структурной биологии в отношении P450 патогенов и человека позволяет вести направленную разработку химических соединений, проявляющих высокую специфичность связывания с мишенью в клетках патогена и не взаимодействующих с белками хозяина. Так, стерол-14 α -деметилаза (CYP51) является ключевым ферментом биосинтеза эргостерола и терапевтической мишенью для нескольких поколений противогрибковых препаратов. Увеличивающееся количество азол-резистентных грибов обуславливает необходимость поиска альтернативных ингибиторов данного фермента.

P450 выполняют ключевые функции в метаболизме микобактерий и могут участвовать в деградации противотуберкулёзных препаратов. По мере накопления информации о P450 патогенных микобактерий, будет значительно упрощен процесс создания новых противотуберкулёзных препаратов, а также будут выяснены механизмы участия P450 в жизнедеятельности и патогенезе микобактерий.

В докладе будет представлена информация в области комплексного структурно-функционального и биоинформационного анализа ферментов семейства цитохромов P450: биосинтеза стероидных гормонов человека (CYP17A1, CYP11A1, CYP11B2, CYP21A2, CYP51A1 и CYP19A1), P450 микобактерий (CYP124, CYP136), CYP51 патогенных грибов грибов родов *Candida* и *Aspergillus*.

S09-03

APPLICATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE TECHNOLOGY IN DRUG DESIGN

Alexis Ivanov, Pavel Ershov, Oksana Gnedenko, Yuri Mezentsev,
Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia

The fast growth of genomics and proteomics has discovered many new potential drug targets and possibility of design of new generation drugs. For realization of this task it is necessary to have modern experimental assays for direct analysis of interactions of lead compounds with new targets. Such assays should be based on uniform technology for any type of target and leads. It can be used for: (i) experimental screening of chemical compounds; (ii) testing of potential leads, found by virtual screening (database mining); (iii) testing of new ligands, created by *de novo* design or by structure optimization of known lead compounds.

The most promising solution to this task is combination of surface plasmon resonance (SPR) and microfluidic technologies implemented in optical biosensors Biacore (GE Healthcare). SPR-biosensors can record in real time the interaction between almost any molecular objects including the interactions of probable lead compounds with drug targets immobilized on a surface of SPR chip. The obtained data allow to calculate K_d value, as well as kinetic and thermodynamic parameters.

A good example of SPR application for drug design is our research of inhibitors of HIV protease (HIVp) dimerization [1-3]. HIVp operates in dimeric form and if specific ligand is bound with dimerization site in subunit it can block the formation of enzyme active form. We realized a strategy of screening of HIVp dimerization inhibitors by integration of *in silico* and *in vitro* technologies. Four hot spots in dimerization site of HIVp have been found using computational alanine scanning and further virtual screening of commercially available compounds from databases gave the list of top hits for subsequent experimental testing by special designed SPR assay for analysis of probable lead compounds interactions with HIVp monomers. As the result we have found several compounds, which preferentially interact with HIVp monomers. The biochemical analysis has shown that some of them inhibit HIVp with micromolar value of IC₅₀.

References

- [1] Ivanov A.S. et al. J. Bioinform.Comput.Biol. 2007, 5(2b), 579.
- [2] Ershov P. et al. Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem., 2009, 3(3), 272.
- [3] Ershov P. et al. Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem., 2012, 6(1), 94.

S09-04**PLASTICITY OF PATHWAYS AND DRUG DISCOVERY****Alexander Kel****¹⁾GeneXplain GmbH, Wolfenbuettel, Germany; ²⁾Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia**

Massive changes of expression of hundreds of genes as well as changes in genomic and epigenomic landscapes are observed in human tissues, such as lung and epithelium after inhalation exposure to toxic chemical compounds. Such changes represent just an “echo” of relatively few causative molecular processes (pathways) in the cells taking place during the formation of the cellular response to the toxic compounds. Non-reversible structural changes in gene regulatory pathways, so-called pathway rewiring, under influence of external toxic agents may cause transformation of the cell homeostasis switching it from the normal state to a chronic disease state or lead to the cell death. Such structural changes often happen due to spreading of epigenetic modifications of chromatin and reaching regulatory regions of key survival or death genes during realization of cellular response to the external toxic agents. We call such structural pathway changes as “walking toxic pathways”. Analysis of this phenomenon helps us to understand the mechanisms of molecular switches (e.g. between programs of cell death and programs of cell survival) and to identify causative biomarkers of toxic processes in the cells and organs. This gives us a chance to predict *in silico* human repeated dose inhalation toxicity for novel chemical compounds after their expression studies in human cells helping to reduce number of necessary animal toxicity studies.

S09-05**COMPUTATIONAL CHEMICAL SYSTEMS BIOLOGY IN POSTGENOMICS DRUG DISCOVERY****Vladimir Poroikov***Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

Fifty years ago in 1964 Corwin Hansch and Toshio Fujita published in JACS their famous report “Rho sigma pi analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure”. According to July 2014 Web of Science search, this first report regarding the general ligand-based drug design approach has been cited 2008 times! Current PubMed search points toward over 170 thousand (Q)SAR-related papers published by thousands of enthusiastic researchers during the past fifty years. Extensive studies of 3D protein structures, development of computational techniques and methods created the basis for molecular modeling that provide the mechanistic interpretation of ligand-target interaction. Today ligand-based, target-based and combined drug design methods are widely used in search and optimization of new lead compounds with improved pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics. The progress of high-throughput postgenomics technologies has led to better understanding of human disorders at the molecular level. Achievements in synthetic organic chemistry have provided a lot of “chemical probes” for studying biological processes in normal and pathological states. Current knowledge suggests that the majority of biologically active compounds interact with multiple molecular targets exhibiting pleiotropic pharmacological actions. Moreover, due to the complex signal transduction processes in cell, interaction with a particular target not always leads to the desirable effect; therefore, we need to study the integrative approaches of “Networks Pharmacology”, “Chemogenomics”, “Chemical Biology”.

My first experience in the field of bioinformatics and computer-aided drug discovery has been acquired under the supervision of Drs. Natalia Esipova and Vladimir Tumanyan about forty years ago. At that time Atlas of Protein Sequence and Structure published by Margaret Dayhoff became available, and it was fascinating to examine the peculiarities in amino acid sequences related to the formation of secondary and tertiary structure of proteins. We analyzed the statistics of distribution for amino acid pairs in proteins and studied the 3D structure of the respective protein fragments by conformational analysis in the pairwise additive approximation (molecular mechanics). By the end of 1980s beginning of 1990s I became involved in the development and application of computational methods, which may be applied to estimate the general biological potential of drug-like molecules based on their structure. As a result of our efforts, computer program PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) was developed. Since the first version appeared in 1993, PASS was improved and extended significantly. Currently it predicts 7,157 biological activities with average accuracy 94.6% based on SAR elucidated from the training set consisted of 959,801 biologically active compounds. Freely available online resource (www.way2drug.com/passonline) is used by 12,000 researchers from 90 countries. Over 300,000 predictions were performed; more than 80 independent published studies confirm PASS predictions by subsequent synthesis and biological testing. To analyze PASS predictions, we developed computer program PharmaExpert, which provides analysis of the cause-effect relationships between the biological activities, examination of possible positive and negative pharmacokinetic and pharmacodynamic drug-drug interactions, search for compounds with multiple mechanisms of pharmacological action, etc. PASS, PharmaExpert and two other our computer programs GUSAR and Net2Target jointly created the basis for computational studies in chemical systems biology. Several examples of *in silico* research of novel pharmaceutical agents and repositioning of known drugs using our computer-aided approaches will be presented.

S09-06**ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ГОМЕОСТАЗА КАЛЬЦИЯ В НЕЙРОНАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА****Е.В. Казначеева¹, В.А. Вигонт¹, Е.Д. Некрасов², С.Л. Киселев², Л.Н. Глушанкова¹, О.А. Зимина¹, М.А. Рязанцева¹.****¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва**

Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым увеличением числа глутамин-кодирующих повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового тракта не должна превышать 35 остатков глутамина.

Связь между экспрессией мутантного хантингтина и процессами дегенерации нейронов до конца не ясна. Все больше исследований указывает на то, что патогенез нейродегенеративных заболеваний, в том числе БХ, связан с нарушениями нейрональной кальциевой сигнализации.

Моделирование БХ в различных клеточных линиях проводили с помощью доставки в клетки генетического конструкта для экспрессии патологического мутантного хантингтина с длиной тракта 138 остатков глутамина.

С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp в конфигурации whole-cell) мы исследовали депо-управляемые токи кальция в моделях БХ на клетках нейробластомы человека (SK-N-SH), нейробластомы мыши (Neuro2A) и первичной культуре нейронов стриатума, изолированных из новорожденных мышей (MSN).

Данные электрофизиологических экспериментов показали, что депо-управляемый вход кальция существенно повышен по сравнению с контролем во всех приведенных клеточных линиях, моделирующих БХ.

Также аномально большой депо-управляемый вход кальция был зарегистрирован в Хантингтон-специфичных нейронах «человека». Нейроны были получены путем дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток, полученных репрограммированием фибробластов, изолированных у пациентов с БХ.

Фармакологический скрининг выявил соединение EVP4593, как потенциальный агент в терапии БХ. Показано, что соединение EVP4593 ингибирует токи через депо-управляемые каналы в моделях БХ на клетках SK-N-SH, MSN, а также на нейронах «человека».

Было сделано заключение о том, что депо-управляемый вход кальция является новой перспективной мишенью для разработки терапевтических подходов к лечению БХ.

Работа поддержана грантами РНФ, РФФИ, программой Молекулярная и клеточная биология, стипендией президента РФ.

S09-07

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЬЮТЕРНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО СКРИНИНГА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗ С РАЗЛИЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Р.Х. Аюпов, Н.И. Акберова

Казанский федеральный университет, Россия

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) – фермент центральной нервной системы, отвечающий за передачу нервного сигнала посредством расщепления нейромедиатора ацетилхолина. Ингибирование фермента проводится для продления нервного импульса при различных заболеваниях, в том числе нейродегенеративных, таких как болезнь Альцгеймера. В данной работе был проведен скрининг ацетилхолинэстераз различными лигандами. В качестве лигандов использовали синтезированные производные пиридоксина [1], производные пиридоксина из базы данных PubChem и, в качестве контроля, известные ингибиторы АХЭ и различные низкомолекулярные соединения. Для скрининга были взяты 23 структуры АХЭ мышей и 44 структуры лиганд. Скрининг проводился в программе AutoDock, в его приложении vina.exe.

Анализировали энергию сродства лигандов к ферменту. Результаты анализа показали, что синтезированные производные пиридоксина объединяются в одну группу, значения энергии сродства от -7 до -9 ккал/моль. В этом же диапазоне значений энергий располагаются 6 производных пиридоксина из PubChem и известные ингибиторы АХЭ: донепезил, физостигмин, такрин и МКС-231 (не является ингибитором АХЭ, он ингибирует обратный захват холина). Контрольные низкомолекулярные соединения показали низкое сродство к активному центру АХЭ, что свидетельствует о потенциальной эффективности синтезированных производных пиридоксина в качестве ингибиторов АХЭ. Холестерин, взятый в качестве одного из контрольных лигандов, показал самый широкий диапазон энергий сродства к активному центру различных АХЭ, от -4 до -11,7 ккал/моль. Это можно объяснить тем, что изученные АХЭ имеют различные размеры полости активного центра, где холестерин мог максимально (или наоборот, минимально) энергетически эффективно расположиться.

Данное исследование показало эффективность компьютерного скрининга для анализа взаимодействия АХЭ с различными лигандами, который может быть необходимым этапом при изучении типов взаимодействия функциональных групп лигандов в активных центрах ферментов.

Литература

1. Аюпов, Р.Х., Акберова Н.И., Тарасов Д.С. Докинг производных пиридоксина в активном центре холинэстераз. // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки – 2011. – Т. 153, кн. 3. – С. 107-118.

S09-08

INHIBITION OF TELOMERASE IS THE BASIS FOR NOVEL ANTI-CANCER THERAPY

Zvereva Maria¹, Azhibek Dulat², Skvortsov Dmitry³, Rubtsova Maria¹, Maguga Alexandr³, Zatsepin Timofey², Dontsova Olga¹

¹*Department of Chemistry and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia;* ²*Department of Chemistry and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia;* ³*Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russia;* ³*Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia*

Telomerase is the key enzyme in the maintenance of telomere length connected to proliferative potential of the cell. Inhibition of the telomerase could be basis of an anti-cancer therapy for the ~90% of human tumors with activated telomerase whereas telomerase activity usually is undetectable in somatic cells. To search for new inhibitors of telomerase we were used two approaches. One is well-known approach based on the screening of small molecules and the other is a new approach for impairing telomerase function at the stage of human telomerase assembly with the application of chimeric bifunctional oligonucleotides. We tested a panel of new metalorganic compounds for telomerase inhibition and for cytotoxic effect. We have found that telomerase-inhibiting compound did not intercalate DNA, inhibited number of other polymerases, accumulated in the cell nucleus, and caused DNA degradation. Preliminary studies revealed that lead compound inhibited human breast adenocarcinoma growth in mice model. Chimeric bifunctional oligonucleotides for telomerase inhibition contain two oligonucleotide parts complementary to the functional domains of telomerase RNA connected with non-nucleotide linkers in different orientations (5'-3', 5'-5' or 3'-3'). Such chimeras inhibited telomerase in vivo in nM concentrations, predominantly due to their effect on telomerase assembly and dimerization. Chimeric bifunctional oligonucleotides for blocking assembly can be used to disrupt the function of any RNA-protein complexes.

Теломераза, РНК-белковый комплекс, является ключевым ферментом для поддержания длины теломера, которая определяет пролиферативный потенциал клетки. Ингибирование теломеразы может быть основой противораковой терапии для ~ 90% типов опухолей человека, так как в них происходит активация теломеразы, тогда как активность теломеразы в соматических клетках в большинстве случаев не обнаруживается. Для поиска новых ингибиторов теломеразы мы использовали два подхода. Первый - это известный подход, основанный на скрининге малых молекул, ингибирующих теломеразы, а другой подход представляет собой новый способ нарушения функции теломеразы на стадии сборки теломеразы человека за счет применения бифункциональных химерных олигонуклеотидов. Мы протестировали группу новых металлоорганических соединений на ингибирование теломеразы и цитотоксический эффект. Мы обнаружили, что соединение хорошо ингибирующее теломеразу, не встраивается в ДНК, ингибирует ряд других полимераз, накапливается в клеточном ядре, и является причиной деградации ДНК. Предварительные исследования показали, что выбранное соединение ингибирует рост аденокарциномы молочной железы на мышиной модели. Химерные бифункциональные олигонуклеотиды для ингибирования теломеразы содержат две олигонуклеотидные части, комплементарные разным функциональным областям теломеразной РНК. Эти части соединены не-нуклеотидным линкером в различных ориентациях (5'-3', 5'-5' или 3'-3'). Такие химеры ингибируют теломеразу в клетке в концентрациях нм, преимущественно за счет их влияния на сборку и димеризацию теломеразы. Такие химерные олигонуклеотиды, блокирующие сборку, могут быть созданы для нарушения функционирования любых РНК-белковых комплексов.

S09-09

SPIDER AND SCORPION VENOM ONLY KILLS OR CAN ALSO HEAL?

Alexander A. Vassilevski, Eugene V. Grishin

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences

Spiders and scorpions are commonly considered vicious, and people often experience fear and disgust when confronted by these creatures. On the other hand, in some cultures spiders symbolize wit and wisdom, and traditional Oriental medicine suggests multiple applications of arachnid venom to treat different disorders.

Research into arachnid venom is directed in three major fields. Historically it was the characterization of structure and mode of action of medically important toxins that first attracted interest. It was then discovered that toxins may be used as precision research tools in neurochemistry and neurobiology, and some are universally utilized as such. Finally, modern investigations are much inclined towards toxin-based drug discovery, and over a dozen natural toxins are currently introduced into the clinic.

In the talk, I will try to outline the major trends in arachnid toxin research and will focus on our recent progress in the field of drug discovery. More specifically, I will address the potential of arachnid toxins as (a) prospective analgesics and (b) tools to combat channelopathies, i.e. diseases caused by dysfunction of ion channels.

S09-10

pH-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ИРР – СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

И.Е.Деев, А.В.Митрофанова, Н.А.Чачина, Е.С.Жевленев, Д.М.Шаяхметова, О.В.Серова, А.Г.Петренко

Институт биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова РАН

В нашей лаборатории ранее был найден клеточный рецептор, способный активироваться под воздействием слабощелочной среды. Этот «сиротский» рецептор из семейства рецепторных тирозинкиназ ранее получил название инсулин рецептор-подобный рецептор (insulin receptor-related receptor, IRR или ИРР) и принадлежит к минисемейству рецептора инсулина, в которое также входят рецептор инсулина (IR) и рецептор инсулин-подобного фактора роста (IGF-IR). ИРР, но не его гомологи IR и IGF-IR, способен активироваться под действием щелочного pH > 7.9. Кривая pH зависимости активации рецептора имеет S-образный вид с величиной полуэффекта около pH 8.3 и насыщением при pH > 9.0, а также с коэффициентом Хилла около 2.4, что указывает на положительную кооперативность процесса активации ИРР. Используя метод разделения фаз в детергенте TritonX-114, мы показали, что при обработке буфером с pH 9.0 в рецепторе ИРР происходят такие же изменения структуры, как и при активации IR инсулином. Активация ИРР щелочным pH приводит к фосфорилированию сигнальных внутриклеточных белков (IRS-1, АКТ-1) и вызывает сильные изменения в цитоскелете клеток. Поскольку активация ИРР слабощелочной средой специфична, дозозависима, приводит к изменению в конформации молекулы ИРР и индуцирует внутриклеточные сигналы, можно заключить, что она имеет все типичные признаки лиганд-рецепторного взаимодействия.

Для определения участков в молекуле ИРР, отвечающих за pH-чувствительность этого рецептора, нами были созданы химерные белки, в которых отдельные домены ИРР были заменены на соответствующие домену IR. Анализ конструкций, показал, что pH чувствительность ИРР определяется его внеклеточной частью. Используя метод автофосфорилирования *in vitro* была определена степень вовлеченности в pH чувствительность рецептора ИРР его различных доменов (L1, C и L2 и FNIII домены), которые находятся во внеклеточной части рецептора. Также были обнаружены пять аминокислотных остатков в первых двух доменах (L1 и C), играющие ключевую роль в pH-активации рецептора. Замена этих аминокислот и третьего домена L2 приводила к уменьшению активности ИРР примерно в 10 раз, причем вклад отдельных аминокислот был относительно невелик, а именно в случае каждой отдельной точечной мутации активность уменьшается на 5-20 процентов. Характер pH-зависимости мутантных конструкций существенно отличается от нативного рецептора тем, что уменьшается или пропадает положительная кооперативность активации, а pH, при котором наблюдается полуэффект сильно сдвигается в щелочную сторону, с 8.5 до 9.1. Таким образом, pH-зависимая активация ИРР определяется мультиточечными взаимодействиями нескольких структурных доменов его внеклеточной части.

S09-11

НАПРАВЛЕННЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КЛАССА ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННЫХ ФЕНОЛОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕРА-, АЗОТ-, ФОСФОРСОДЕРЖАЩИМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ

А.Л. Тараканова¹, Л.П. Шамсутдинова, ¹Р.К. Исмагилов¹, М.Б. Газизов¹, И.И. Семина², М.П. Шулаева³

¹ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»; ²ФГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»; ³ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия»

На стадии планирования лабораторных исследований биологической активности соединений необходимо проведение предварительного прогнозирования и выявление возможных фармакологических эффектов. К числу программ, с помощью которых можно осуществлять данный прогноз, относится программа PASS [1].

Исследования, проведенные на кафедре органической химии КНИТУ, позволили обнаружить ряд реакций моно- и полиорганогалогенидов с некоторыми апротонными неионогенными нуклеофилами, приводящих к продуктам обмена или дегидрогалогенирования. Практическая значимость научных работ состоит в разработке новых доступных методов синтеза Р-, 2Р-, N-, 2N-, Р,N-, 2Р, 2N, S-содержащих пространственно-затрудненных фенолов.

Нами был произведен расчет по программе PASS некоторых синтезированных соединений. Согласно результатам прогноза биологической активности для исследуемых полифункциональных соединений наиболее вероятно проявление иммунодепрессивной, инсектицидной, анестезирующей, обезболивающей, ноотропной, акарицидной, бактерицидной и других видов активности.

Экспериментальное изучение биологической активности полученных соединений позволило выявить вещества, обладающие психотропной, бактерицидной, антимикотической активностью. Водорастворимые моно- и дигидразиневые соли проявили нейротропное действие при испытании на угнетение двигательной активности и ориентированной реакции мышей. Выявлен ряд соединений, проявивших высокую активность по отношению к стафилококкам (*Staphylococcus aureus*), кишечной палочке (*Escherichia coli*), синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), антимикотическую активность в отношении грибов рода *Candida albicans* и в отношении бацилл (*B.cereus*).

Поскольку результаты прогноза биологической активности, полученные с помощью системы PASS, подтверждаются экспериментальными данными, нами был сделан вывод о возможности использования расчетов для дальнейших поисков полезных прикладных свойств синтезированных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №13-03-97098_рПоволжье_а/2013 и Минобрнауки РФ (задание №2014/56 в рамках базовой части госзадания).

Литература

Филимонов Д.А., Поройков В.В. Прогноз биологической активности органических соединений // Российский химический журнал. 2006. №2(1).С. 66-75.

S09-12**ТРАНСКРИПТОМИКА МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ****В.Н. Лазарев****ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия**

Интенсивное и, зачастую, бесконтрольное использование антибиотиков в медицинской практике ведет к появлению резистентных к этим препаратам бактериальных штаммов. Для решения данной проблемы необходимо создание новых антибактериальных средств. В качестве перспективных кандидатов рассматриваются антимикробные пептиды (АМП), обнаруженные у всех живых организмов и являющиеся частью системы врожденного иммунитета.

Среди беспозвоночных наиболее изученными являются АМП членистоногих, в то время как АМП аннелид (кольчатых червей) практически неизвестны. Тем не менее, среди аннелид, медицинская пиявка (МП) является настоящей «природной фармакопеей». Гирудотерапия (лечение пиявками) - одна из древнейших областей медицины, изображения сцен применения пиявок можно обнаружить среди фресок гробниц египетских фараонов. Незаслуженно забытая после стремительного развития фармакологии, сегодня гирудотерапия переживает второе рождение. Компоненты секрета слюнных желез МП обладают противовоспалительными, анальгезирующими, противосвертывающими, тромболитическими и антимикробными свойствами.

Несмотря на растущий интерес к секрету слюнных желез МП, ничтожно мало сделано в области геномики, транскриптомики и протеомики МП. Нашей целью является системный анализ секрета МП и первым шагом стал транскриптомный анализ клеток слюнных желез. Известно, что различные виды МП продуцируют различный по составу секрет, поэтому для транскриптомного анализа мы использовали три вида медицинских пиявок, использующихся в гирудотерапии: *Hirudo medicinalis*, *H. verbana* и *H. orientalis*.

Для прецизионной изоляции клеток слюнных желез мы разработали оригинальный метод лазерной микродиссекции клеток слюнных желез МП и клеток мышечной ткани трех видов МП. После выделения тотальной РНК были приготовлены нормализованные библиотеки кДНК, секвенирование которых было выполнено на платформе IonTorrentPGM. Для каждого образца получено более 1,000,000 прочтений и проведен первичный биоинформатический анализ.

Таким образом, впервые был проанализирован транскриптом МП трех видов, что позволило сделать нам первый шаг к системному анализу богатейшего источника биологически активных белков и пептидов – секрету слюнных желез медицинской пиявки.

S09-13

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ НМДА РЕЦЕПТОРОВ НА АМПЛИТУДУ МИНИАТЮРНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ КОНЦЕВОЙ ПЛАСТИНКИ У МЫШЕЙ НОКАУТНЫХ ПО ОТДЕЛЬНЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ФОРМАМ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

С.Е. Проскурина¹, К.А. Петров², Э.Креш³, А.Д. Никиташина⁴, Е.Е. Никольский⁵

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия,* ²*Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, К(П)ФУ Казань, Россия,* ³*Laboratoire de Neurobiologie, Centre National de la Recherche Scientifique Unite Associee 295, Paris, France,* ⁴*Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия,* ⁵*КГМУ, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, К(П)ФУ Казань, Россия*

Одним из ключевых ферментов синаптической передачи является ацетилхолинэстераза (АХЭ), она ограничивает время действия ацетилхолина (АХ), гидролизует его до холина и ацетата. Т.к. активность синаптической АХЭ определяет время действия АХ, и, таким образом, амплитуду и длительность постсинаптических ответов, то способы влияния на работу этого фермента стали предметом многих исследований. Так, ингибирование АХЭ различными препаратами используется в медицинской практике для восстановления синаптической передачи (при миастении, болезни Альцгеймера). Но ничего не было известно о механизмах эндогенной модуляции активности АХЭ. Недавно нами было показано, что в области нервно-мышечного контакта есть популяция НМДА рецепторов, активация которых способна усиливать синтез NO, а тот способен ингибировать активность АХЭ, увеличивая, тем самым, амплитуду постсинаптических потенциалов. В синаптической области АХЭ представлена двумя молекулярными формами, отличающимися якорными субъединицами – CoQ или PRiMA. Комплексы АХЭ, содержащие CoQ заякорены на базальной мембране нервно-мышечного соединения, а комплексы АХЭ, содержащие PRiMA – на плазматической мембране. Различия в расположении могут быть важны, т.к. АХЭ на плазматической мембране может быть ко-локализована с комплексом НМДА рецепторы/NO-синтаза и, поэтому, более эффективно ингибироваться NO. В данном исследовании мы попытались ответить на вопрос, специфично ли действует оксид азота на конкретную молекулярную форму АХЭ? Для этого провели регистрацию миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) в синапсах мышц мышей дикого типа и мышей мутантных линий, у которых отсутствует АХЭ, заякоренная либо PRiMA, либо CoQ. Результаты показали, что после «удаления» из синаптической щели любой из двух молекулярных форм АХЭ, аппликация глутамата не оказывает эффекта на амплитуду МПКП. Полученные результаты показывают, что действие NO, продуцируемого в результате активации фермента NO-синтазы, которая запускается глутамат-опосредованным возбуждением синаптических НМДА-рецепторов, неспецифично для различных молекулярных форм АХЭ.

S09-14

ФАРМАКОФОРНЫЕ МОДЕЛИ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

Ф. В. Шишкин, А. И. Кузьменков, А. А. Василевский, А. О. Чугунов, Р. Г. Ефремов
ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Пептидные токсины из ядов животных — основа ряда фармакологических методов изучения принципов функционирования ионных каналов. Объектом данной работы стали токсины из яда скорпионов, блокирующие работу потенциал-управляемых калиевых каналов трёх типов, обозначаемых $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.3$. Среди этих токсинов обнаруживаются как молекулы, строго селективные на каналы одного типа, так и пептиды с множественной активностью. Цель исследования заключалась в том, чтобы найти группы аминокислотных остатков, образующие в пространственной структуре токсина фармакофор, который позволяет селективно связываться с каналом-мишенью. Для решения поставленной задачи применяли методы моделирования структуры токсинов по гомологии, расчёты молекулярной динамики токсинов в водном растворе, а также построение карт распределения молекулярного гидрофобного потенциала на поверхности токсинов [1].

Сравнение карт распределения гидрофобных и гидрофильных свойств на поверхности токсинов с одинаковой активностью позволило идентифицировать в них потенциальные канал-специфичные трёхмерные фармакофоры. Обнаруженные фармакофоры локализованы вблизи постулированной ранее функциональной диады [2], образованной положительно заряженным и гидрофобным аминокислотными остатками, а у некоторых токсинов включают её в свой состав. Полученные модели фармакофоров обладают геометрическими параметрами, сходными у токсинов с одинаковой биологической активностью и различными у блокаторов, специфичных к разным типам калиевых каналов. Полученные результаты свидетельствуют о существовании более тонкого механизма взаимодействия токсинов с калиевыми каналами, нежели следует из концепции функциональной диады, и в будущем послужат основанием для рациональной модификации токсинов с целью модуляции их биологической активности.

Литература

- [1] Koromyslova A. D., Chugunov A. O., Efremov R. G. Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method. *J ChemInf Model* (2014), 54 (4): 1189–99.
- [2] Mouhat S., De Waard M., Sabatier J.-M. Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated K_v1 -type channels. *JPeptSci* (2005), 11 (2): 65–8.

S09-15

СОЗДАНИЕ СУПЕРПРОДУЦЕНТА БАЦИЛЛЯРНЫХ ПРОТЕИНАЗ НА ОСНОВЕ LIKE-СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ

А.О.Тихонова, А.А.Тойменцева, М.Р.Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

Интерес к протеиназам бактерий объясняется недостаточной способностью известных протеолитических ферментов животных и растений удовлетворять жизненные потребности населения планеты, поэтому поиск и оптимизация штаммов-продуцентов является важной биотехнологической задачей. В настоящей работе в качестве модельных белков использовали субтилизиноподобную протеиназу (AprBp) и глутамилэндопептидазу (GseBp) *Bacillus pumilus* 3-19. Гены модельных белков (*aprBp* и *gseBp*) клонировали в LIKE-систему экспрессии под контроль сильного индуцируемого промотора P_{Lial} . Ранее промотор P_{Lial} показал свою эффективность в отношении увеличения экспрессии модельных внутриклеточных белков - *gfp* до 1000 раз, *lacZ* - до 400 раз.

Для увеличения выхода целевых белков (AprBp, GseBp) применили стратегию оптимизации LIKE-системы экспрессии с использованием сигнальных пептидов. Проанализировав данные литературы, выбрали три сигнальные последовательности *B. megaterium* (SP_{Pac} , SP_{Yngk} и SP_{Asp}). Выбранные сигнальные последовательности показали высокий уровень секреции рекомбинантной внеклеточной гидролазы *Thermobifida fusca* – в 6 раз выше по сравнению с собственным сигнальным пептидом фермента. *In silico* оценивали потенциальный уровень секреции собственных сигнальных пептидов сериновых протеиназ *B. pumilus* 3-19 (SP_{AprBp} и SP_{GseBp}) и выбранных рекомбинантных сигнальных пептидов с использованием программы PrediSi (www.predisi.de). Значение, вычисленное на сервере PrediSi, свидетельствует о том, может ли аминокислотная последовательность функционировать в качестве сигнального пептида: если значение (D-score/индекс эффективности) составляет 0.8-1.0 – считают, что аминокислотная последовательность представляет собой сигнальный пептид, значение 0.5-0.7 – говорит о вероятной функции сигнального пептида, значение ≤ 0.5 – аминокислотная последовательность не является сигнальным пептидом. Индекс эффективности секреции собственных сигнальных пептидов сериновых протеиназ AprBp и GseBp *B. pumilus* составил – 0.6 и 0.67, соответственно. Индекс эффективности рекомбинантных сигнальных пептидов составил – 0.7 для SP_{Pac} , 0.99 для SP_{Yngk} и 0.81 для SP_{Asp} .

Для повышения секреции протеиназ гены *aprBp* и *gseBp* под контролем промотора P_{Lial} и рекомбинантных сигнальных пептидов трансформировали в беспротеазный штамм *B. subtilis* BG2036. Протеолитическую активность штаммов оценивали на чашках с молочным агаром, в качестве индуктора LIKE-системы экспрессии использовали антибиотик бацитрацин. Сравнивали зоны гидролиза конструкций с рекомбинантными сигнальными пептидами и конструкций с генами протеиназ под собственными сигнальными пептидами. Протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы не повышалась в конструкциях с рекомбинантными сигнальными пептидами. Протеолитическая активность глутамилэндопептидазы была выше в 2 раза под контролем рекомбинантного сигнального пептида SP_{Yngk} , и концентрации бацитрацина - 50 мкг/мл. В дальнейшем будет исследована специфическая протеолитическая активность полученных рекомбинантных конструкций. Предварительные результаты показали, что стратегия поиска рекомбинантного сигнального пептида в сочетании с беспротеазными штаммами является эффективной для повышения секреции глутамилэндопептидазы.

S09-16**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА****В.В.Иванова, И.Г.Старостина, А.А.Ризванов*****Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия***

Болезнь Паркинсона — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся двумя основными формами возникновения: наследственной и спорадической. Как известно, спорадическая форма болезни Паркинсона не передается по наследству. Однако эпигенетическая программа восстановления и работы нейронов экстрапирамидной моторной системы нарушаются. Современная медицина пока не может излечить заболевание или замедлить его прогрессирование с помощью этиологической или патогенетической терапии, существующие методы консервативного и оперативного лечения позволяют только улучшить качество жизни больных. Но, поскольку это заболевание эпигенетической природы, данное состояние возможно реверсировать методами генной терапии, а именно корректировкой транскрипции и экспрессии генов кандидатов, с отклонением от нормальной программы реализации экспрессии на клеточном уровне.

На основе этой гипотезы об этиологии болезни Паркинсона, а именно спорадической формы, нами разработаны методы тестирования потенциальных лекарственных препаратов на основе изучения метаболического стресса клеток. Были выявлены комбинации микро-РНК, генопрепаратов и химических веществ с потенциальным терапевтическим эффектом для лечения данного заболевания.

Задачей исследования является разработка тест-системы на основе метаболического стресса клеток, полученных от пациентов со спорадической формой болезни Паркинсона, для скрининга потенциальных лекарственных препаратов; идентификации комбинаций микро-РНК, генопрепаратов и химических веществ, модулирующих структуру хроматина, для реверсии к нормальному состоянию фибробластов, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона, путем коррекции эпигенетического статуса клеток.

S09-17

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ЕГО ПРОМОТОРА

А.М.Черемин, А.О.Тихонова, М.Р.Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

Сериновые протеиназы бактерий представляют интерес для изучения физиологии микробной клетки, а также их практического внедрения в промышленность и медицину. Известно, что при истощении питательной среды, грамположительные бактерии синтезируют ферменты деградации, среди которых большую часть составляют сериновые протеиназы. Так бактерии *Bacillus pumilus* секретируют в среду сериновую субтилизиноподобную протеиназу, которая составляет 70% от общего количества всех внеклеточных протеиназ. Синтез ферментов деградации контролирует двухкомпонентная система трансдукции сигнала DegS-DegU. Целью настоящей работы явилось повышение экспрессии *aprBp* гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* путем модификации его промотора. Методом сайт-направленного мутагенеза в промоторе гена *aprBp* (P_{aprBp}) были изменены два потенциальных регуляторных сайта взаимодействия с фактором транскрипции DegU-P до их полной гомологии с известными консенсусными последовательностями – GNCATTTAn(n)GNCATTТА. Нативный (неизмененный) промотор использовали в качестве контроля. Модифицированные промоторы клонировали в вектор, содержащий репортерный ген *lacZ*, и трансформировали в реципиентный штамм *B. subtilis* 168. Методом ПЦР в режиме реального времени было показано, что при модификации одного из регуляторных сайтов уровень мРНК гена *lacZ* увеличился в 52 раза относительно контроля. Таким образом, в результате модификации промоторной области гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* получили повышение экспрессии этого белка. Разработанный метод с модификацией промоторной области гена может быть применен при создании штаммов с повышенной экспрессией гетерологичного белка без изменения его первичной структуры.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект №14-83).

S09-18

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ

SALMONELLA TYPHIMURIUM

К.И.Гарифулина, Шах Махмуд Раихан

ФГАОУ ВПО КФУ, Казань, Российская Федерация

В последнее время в научных кругах все более интенсивно стали заниматься исследованием генетических материалов бактериофагов с целью изучить противобактериальные механизмы вирусов. В природе количество бактериофагов совсем не тождественно количеству бактерий, а, напротив, превышает число видов бактерий. Помимо этого, поверхностная структура бактериофагов также намного отличается от бактериальной, поэтому на сегодняшний день разрушение поверхностных оболочек вируса - капсида и выделение нуклеиновых кислот является актуальной темой. Нашей целью было выделение нуклеиновых кислот вирусов бактерий, полученных из природных источников.

Материалы и методы исследования. В качестве индикаторных культур в работе использовался штамм *Salmonella typhimurium* TA из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии КФУ.

Ранее, выделение чистого фага проводилось путем последовательных пассажей морфологически однотипных негативных колоний на индикаторной культуре. Мы проводили размножение бактериофага при помощи метода Грация и модифицированного метода Фишера. Очищение суспензии бактериофага от бактерий и питательных компонентов, что немаловажно для получения чистой суспензии, из которой в дальнейшем выделялась нуклеиновая кислота, происходило при помощи трех способов. Первый способ: исследуемый материал обрабатывали хлороформом, затем прогревали при 58-60°C в течение 30 мин. Второй способ: после осаждения почвы и большого количества бактерий вирусосодержащую суспензию отфильтровывали через бумажный фильтр, а затем фильтрацией через 0,45 мкм фильтр (Millipore, США). Удаление клеточных нуклеиновых кислот (Н.К.) проводили при помощи ДЕАЕ целлюлозы, а также используя ферменты - неспецифические рибонуклеазы и ДНКазы, затем удаляли низкомолекулярные нуклеотиды. Концентрирование фагов проводили с помощью центрифужного концентратора 10kD (Millipore, США).

Разрушение фаговых капсидов происходило модифицированным методом с использованием отдельно ЭДТА-Na, pH 8,0 в комплексе с протеиназой К и додецилсульфата натрия. Для выделения нуклеиновой кислоты использовали фенол и хлороформный стандартный метод и осаждали ацетатом натрия и 96 % этиловым спиртом.

Результаты и обсуждение. В качестве контроля был произведен посев бактериальной культуры без бактериофага (рисунок 2, а). Исходная суспензия содержала небольшую концентрацию фагов (рисунок 2, б). Затем произошло последовательное изменение количества вирусных частиц *Salmonella typhimurium* (рисунок 2, в) в ходе очистки вирусных нуклеиновых кислот и они показали ожидаемые результаты, а именно, после концентрирования, количество вирусных частиц увеличилось в 20, 10 и 6 раз по отношению к предыдущим этапам (рисунок 2, в). Однако после разрушения фаговых капсидов вирус теряет жизнеспособность, поэтому мы не наблюдали появления бляшкообразующих единиц в виде зон лизиса (рисунок 2, г).

Количество нуклеиновых кислот в растворе (рисунок 1, Б) снижается на двух последовательных этапах, и на третьем этапе количество нуклеиновых кислот, а именно бактериальных, резко уменьшается. После разрушения фага произошел активный выход фаговой нуклеиновой кислоты и возрастание ее содержания в растворе. Своего максимума количество достигло на этапе выделения и осаждения, что говорит о хорошем выходе нуклеиновой кислоты фага.

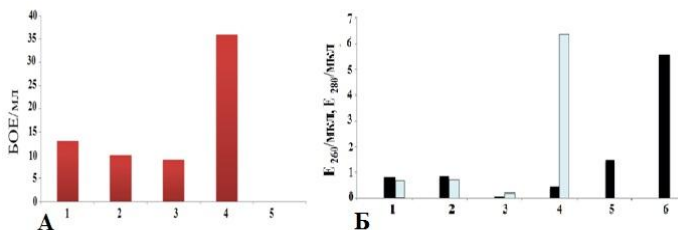


Рисунок 1.- А) Изменение количества вирусных частиц фага *S. typhimurium*.
 Б) Изменение количества нуклеиновых кислот и белка в суспензии фага.

1- До удаления бактерий, 2- после удаления бактерий, 3- После удаления Н.К. бактерий, 4- Сконцентрированный фаг, 5-Разрушенный фаг, 6- Выделенная и осажденная Н.К. фага.

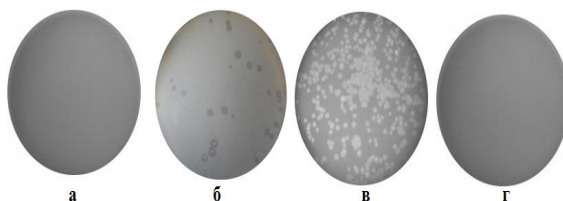


Рисунок 2.- а) Контрольный посев бактерий без бактериофага; б) Исходные суспензии фагов, посев по методу Грация; в) Фаги, сконцентрированные при помощи центрифужного концентратора; г) Разрушенный бактериофаг

В результате проведенного нами эксперимента были модифицированы методы очистки фаговой суспензии, способы ее концентрирования. Помимо этого, были подобраны условия разрушения бактериофага и выделения фаговой нуклеиновой кислоты, а также способы ее осаждения.

S09-19**ОЦЕНКА МУТАГЕННЫХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ХИТОЗАНЕ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ
В КАЧЕСТВЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ****Д.Р.Байдамшина¹, М.Г.Холявка², А.Р.Каюмов¹****¹К(П)ФУ. г. Казань, Россия, ²ВГУ. г. Воронеж, Россия**

Одним из современных направлений биотехнологии является создание перевязочных средств с иммобилизованными на нерастворимых носителях ферментами для лучшего ранозаживления. При закреплении ферментов на нерастворимых носителях получают гетерогенные биокатализаторы, которые обладают преимуществами: повышается не только стабильность, но и эффективность полученного препарата за счет управления процессом протекания реакции. Перспективными носителями являются хитозаны. Молекулы хитозана содержат гидроксильные и аминогруппы, его полимерная матрица позволяет иммобилизовать ферменты, как внутри сетки, так и на ее поверхности. Производные хитозанов характеризуются нетоксичностью и слабой иммуногенностью. Целью работы был анализ степени токсичности ферментов и хитозанов для клеток про- и эукариот. Концентрация ферментов составляла 1 мкг/мл, а также 10 мкг/мл, что соответствует превышению планируемой фармацевтической концентрации в 10 раз. Установлено, что трипсин и все варианты хитозана не продемонстрировали мутагенного действия в тесте Эймса. РНКаза и ДНКаза показали мутагенный эффект, и, следовательно, не могут быть рекомендованы к использованию.

Также исследовали цитотоксичность соединений, в МТС-тесте на клетках линии MCF7. Все соединения не являются токсичными и могут быть использованы в качестве ранозаживляющих препаратов. Кроме MTS теста, также исследовали морфологию клеток, пролиферирующих в присутствии ферментов и хитозанов. Результаты микроскопии показали, что ни одно из исследуемых соединений не вызывало изменений в морфологии клеток и не оказывало цитостатического эффекта, в отличие от положительного контроля – азида натрия. Надо отметить, что присутствие трипсина усиливало пролиферацию клеток, следовательно, можно ожидать высокого заживляющего эффекта этого фермента. Присутствие всех видов хитозана кроме сукцинатахитозана также не нарушало морфологии клеток. Нерастворимые примеси в сукцинатахитозана значительно обрастали клетками измененной формы, в меньшей степени такая картина наблюдалась в случае высокомолекулярного хитозана. Этот факт также требует более глубокого исследования, поскольку данный эффект может негативно сказаться при использовании данных видов хитозанов при клиническом использовании с иммобилизованными ферментами.

S09-20

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНК НА ОСНОВЕ ФУРАНОНОВ И ПИРРОЛЛИНОВ

А.А.Нуреева, А.Р.Каюмов, Е.Ю.Тризна

К(П)ФУ. г. Казань, Россия

В настоящее время многие патогены человека приобрели устойчивость к действию антибиотиков, что объясняет необходимость поиска новых антибактериальных препаратов. Стафилококки являются одними из основных внутрибольничных патогенов, вызывающих инфекции на медицинских имплантатах. Это обусловлено образованием биопленок этими бактериями. В составе биопленок они повышают устойчивость к иммунной системе человека, антибиотикам. Поэтому актуальной проблемой является поиск новых препаратов, подавляющих рост и образование биопленок бактериями.

Показано, что галогенированные фураноны, обладают антимикробными свойствами и подавляют микробную колонизацию на поверхности водорослей.

Целью работы было идентифицировать производные фуранонов, эффективно подавляющих рост и образование биопленок бактериями *Staphylococcus*.

В Химическом институте КФУ были синтезированы галоген-производные фуранонов. Нами был проведен скрининг соединений подавляющих рост и образование биопленок бактериями *S. Aureus* и *S. epidermidis*. В результате были отобраны 6 соединений, которые подавляли рост и образование биопленок бактериями более чем в 3 раза (Ф1, Ф6, Ф8, Ф29, Ф35, Ф83).

Минимальная ингибирующая концентрация Ф8, Ф29, Ф83 составила 25 мкг/мл, а для Ф1, Ф6, Ф35 - 5 мкг/мл. Также исследовали цитотоксичность отобранных соединений, в МТС-тесте на клетках линии MCF7 и клетках фибробластов человека. По полученным данным подсчитывали коэффициент цитотоксичности CC_{50} . Наименьшей цитотоксичностью для обеих линий клеток, обладали Ф29 и Ф35.

С помощью электронной микроскопии был установлен цитостатический эффект соединений и их влияние на морфологию клеток. Практически все соединения изменяли морфологию клеток и подавляли их деление при концентрации 10 мкг/мл. Однако Ф35 не влиял на морфологию клеток и способность к делению даже при концентрации 50 мкг/мл.

Таким образом, можно сделать вывод, что Ф35 может быть агентом, подавляющим образование биопленок бактериями *Staphylococcus*, при этом обладать более слабым эффектом против других бактерий. Кроме того, Ф35 не оказывает цитотоксического эффекта на клетки эукариот. Следовательно, Ф35 может быть перспективным соединением в сфере медицины, используемым для обработки поверхностей и медицинского оборудования для предотвращения образования биопленок.

S09-21

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО И ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСОВ ГРИППА А

Шах Махмуд Р.¹, Мустафа А.², Канрай П.², Ульянова В.В.¹, Дзициаловски Ю.², Вершинина В.И.¹, Ильинская О.Н.¹

¹*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия,* ²*Институт медицинской вирусологии, Гиссенский университет им. Юстуса-Либиха, Гиссен, Германия*

Бактериальная рибонуклеаза (биназа) в течение многих лет привлекает внимание ученых в России и за рубежом благодаря своей биологической активности, в частности противовирусному эффекту, механизм которого до сих пор не изучен. Знание молекулярных механизмов действия рибонуклеазы важно для использования фермента в медицине. Целью данной работы явилось установление влияния биназы на экспрессию генов одного из наиболее опасных РНК-содержащих вирусов - вируса гриппа А. Для этого была определена цитотоксическая концентрация (CC₅₀) биназы по отношению к клеткам млекопитающих и изучена экспрессия генов полимеразного комплекса вируса гриппа разных подтипов под действием рибонуклеазы.

В работе использовали клетки почек кокер-спаниеля линии MDCKII и почки человеческого эмбриона линии 293T; пандемический вирус “свиного гриппа” A/Hamburg/04/09 (H1N1), плазмиды pHW- PB1, pHW- PB2, pHW- PA, pHW- NP, кодирующие гены полимеразного комплекса вируса гриппа А, и репортерную плазмиду rPOL1-GFP-RT, экспрессирующую GFP белок с помощью PB1, PB2, PA, NP белков (любезно предоставленные профессором С. Плешка, Гиссен, Германия). Установлено, что биназа в низкой концентрации не является цитотоксичной по отношению к клеткам MDCK. При инкубации в течение 48 ч. CC₅₀ фермента составила 490 мкг/мл. Активность фермента в концентрации 100 мкг/мл в культуральной среде клеток MDCK через 48 ч. снижалась на 75%, то есть фермент оставался активным.

Эксперименты по изучению противовирусного действия биназы проводили, пре-инкубируя вирус с биназой и инфицируя клетки этой суспензией. В первом жизненном цикле вируса биназа в низкой концентрации не влияла на размножение вируса, однако в последующих циклах фермент в концентрации 1 мкг/мл подавлял размножение вируса гриппа А (H1N1). С использованием цитофлуориметрического метода оценки интенсивности свечения GFP белка показано, что биназа снижала экспрессию полимеразного комплекса вируса пандемического гриппа А подтипа H1N1, вируса птичьего гриппа А подтипов H5N1 и H7N9 в 2, 10 и 3 раза, соответственно. Таким образом, биназа проявляет противовирусное действие в отношении вируса гриппа А на генном уровне в клетке.

Авторы выражают глубокую признательность профессору С. Плешке за возможность проведения экспериментов и обсуждение результатов.

S10-01

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IDENTIFIES THREE NOVEL GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH ELITE ENDURANCE PERFORMANCE IN RUSSIANS

Ahmetov I.I.^{1,2,3}, Kulemin N.A.^{3,4}, Popov D.V.⁵, Naumov V.A.³, Akimov E.B.⁶, Bravy Y.R.⁵, Egorova E.S.², Galeeva A.A.¹, Generozov E.V.³, Kostryukova E.S.³, Larin A.K.³, Mustafina L.J.^{1,2}, Ospanova E.A.³, Pavlenko A.V.³, Alexeev D.G.³, Vinogradova O.L.⁵, Govorun V.M.³

¹*Volga Region State Academy of Physical Culture, Sport and Tourism, Sport Technology Research Centre, Kazan, Russia;* ²*Kazan State Medical University, Laboratory of Molecular Genetics, Kazan, Russia;* ³*Research Institute for Physical-Chemical Medicine, Department of Molecular Biology and Genetics, Moscow, Russia;* ⁴*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia;* ⁵*SSC RF Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Exercise Physiology, Moscow, Russia;* ⁶*Centre for Sports Innovation Technologies and National Teams of the Moscow Department of Physical Culture and Sport, Moscow, Russia*

The aim of the study was to investigate the association between multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs), aerobic performance and elite endurance athlete status in Russians. By using GWAS approach, we examined the association between 1,140,419 SNPs and relative maximal oxygen consumption rate ($\dot{V}O_2\text{max}$) in 80 international-level Russian endurance athletes (46 males and 34 females). To validate obtained results, we further performed case-control studies by comparing the frequencies of the most significant SNPs (with $P=10^{-5}$ - 10^{-8}) between 218 endurance athletes and opposite cohorts (192 Russian controls and 230 Russian power athletes). Initially, six 'endurance alleles' were identified showing discrete associations with $\dot{V}O_2\text{max}$ both in males and females. Next, case-control studies resulted in remaining three SNPs (NFIA-AS2 rs1572312, TSHR rs7144481, RBFOX1 rs7191721) associated with endurance athlete status. The C allele of the most significant SNP, rs1572312, was associated with high values of $\dot{V}O_2\text{max}$ (males: $P = 0.0051$; females: $P = 0.0005$). Furthermore, the frequency of the rs1572312 C allele was significantly higher in elite endurance athletes (95.5%) in comparison with non-elite endurance athletes (89.8%, $P = 0.0257$), Russian (88.8%, $P = 0.007$) controls and power athletes (86.2%, $P = 0.0005$). The rs1572312 SNP is located on the nuclear factor I A antisense RNA 2 (NFIA-AS2) gene which is supposed to regulate the expression of the NFIA gene (encodes transcription factor involved in activation of erythropoiesis and repression of the granulopoiesis). In conclusion, our data show that the NFIA-AS2 rs1572312, TSHR rs7144481 and RBFOX1 rs7191721 polymorphisms are associated with aerobic performance and elite endurance athlete status.

S10-02

THE EFFECT OF GENETIC VARIANTS ON MUSCULAR PERFORMANCE AND SPRINT/POWER PHENOTYPE

Valentina Gineviciene¹, Audrone Jakaitiene¹, Algirdas Utkus¹, Vaidutis Kucinskas¹, Linas Tubelis²

¹*Department of Human and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Vilnius University,* ²*Lithuanian University of Educational Sciences*

Human physical performance is a polygenic trait influenced by genetic and environmental factors. Progress in molecular genetic techniques gave us molecular markers to determine specific genes and their implications for endurance, muscle strength, sprint, power and other athletic performance phenotypes. Based on current research 6 potential biomarkers known to have influence on human physical capacity were chosen for the genetic analysis of the Lithuanian athletes (n=250, endurance-oriented n=112, power-oriented n=50, “mixed group” n=88) and general population (healthy nonathletes controls group, n=250): ACE (I/D), AGT (C704T), AGTR1 (A1166C), AMPD1 (C34T), ACTN3 (R577X), MB (A79G). The objective of our research was to evaluate the significance of these genetic variants on muscle performance phenotype (anthropometric measurements; maximal isometric power of the forearm muscles (handgrip test); short-term explosive muscle power (STEMP, vertical jump test); anaerobic alactic maximum power (AAMP, stair climbing test)) in Lithuanian athletes. Most often, reports on the Renin-Angiotensin System gene polymorphisms have focused on the ACE-D, AGT-T and AGTR1-C alleles, and its association with pathological events (cardiovascular complications). In the study, we look from different perspective analysing the importance of ACE, AGT and AGTR1 polymorphisms via their physiological effects in athletes. Statistical significance was reached for ACE and AGTR1 but not for AGT polymorphism. We found that the influence of ACE and AGTR1 polymorphisms on the phenotype is different depending on gender and associated with a complex phenotypic characteristic. The athletes, carriers of the ACE II and AGTR1 AA genotypes in the power group had higher muscle mass, handgrip strength and STEMP compared to the ACE DD and AGTR1 CC genotype athletes. According our results, ACE-I allele was more frequent in the Lithuanian power group compared to other sports groups and the control. Muscle function is strongly associated with genes affecting muscle energy metabolism during intense exercise. AMPD1 (C34T), which functions in skeletal muscle metabolism and is involved in the regulation of muscle glycolysis during rigorous exercise, was evaluated in our study. The results indicate that the frequency of the AMPD1 TT genotype was 2.4% in the control group, while it was absent in the athlete group. There were significantly higher proportion of power-orientated athletes with the CC genotype (86.3%) compared with the endurance athletes (72.9%), mixed athletes (67.1%), and controls (74.2%). Males carriers of the AMPD1 CC genotype had higher STEMP compared to the CT genotype male athletes (P=0.018). For AMPD1 CC genotype the AAMP and STEMP value of athletes from the power group was significantly higher than that of the endurance group athletes. Myoglobin plays a crucial role in energy metabolism by carrying molecular oxygen between the capillaries and the mitochondria to satisfy the requirement for sustained work. Although genetic variation (A79G) in myoglobin (MB) gene has long been recognized in humans, there is little information on the functional implications of such variation and almost no data from elite athletes. In our study the frequency of MB-A allele was higher in endurance athletes than in controls (P=0.001). The power athletes with the MB GG genotype had significantly higher height, muscle mass, grip strength and STEMP than AA genotyped athletes. The other candidate gene considered in this study was the ACTN3 gene (encodes the protein α -actinin-3) and its nonsense polymorphism (R577X). ACTN3 R577X has been associated with a significant effect to the function of skeletal muscle fibers. Our results indicate that ACTN3 XX homozygous athletes have typically higher STEMP and AAMP than the RR genotype athletes (P<0.05). Summarizing the results we conclude that the athletes, carriers of the ACE II, AGTR1 AA, AMPD1 CC MB GG, ACTN3 XX, genotypes, have better ability to achieve high muscle capacity indexes when exercising short-term explosive muscle power tasks. Major differences in the athletic performance cannot be explained solely on the basis of ACTN3 genotypes. ACTN3 XX genotype was reported as negatively associated with elite sprint athlete performance. Therefore we conclude that the absence of a

functional ACTN3 in fast-twitch muscle fibers might be compensated most likely by ACTN2 or other enzymes that take part in anaerobic muscle metabolism. It is possible that ACTN3 has only an additive effect to the effects of the other genes towards developing the winning phenotypes in power-oriented sports.

S10-03

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IN RUSSIAN STRENGTH ATHLETES

Egorova E.S.¹, Galeeva A.A.², Mustafina L.J.^{1,2}, Kulemin N.A.^{3,4}, Naumov V.A.³, Generozov E.V.³, Kostryukova E.S.³, Larin A.K.³, Ospanova E.A.³, Pavlenko A.V.³, Alexeev D.G.³, Govorun V.M.³, Ahmetov I.I.^{1,2,3}

¹Kazan State Medical University, Laboratory of Molecular Genetics, Kazan, Russia; ²Volga Region State Academy of Physical Culture, Sport and Tourism, Sport Technology Research Centre, Kazan, Russia; ³Research Institute for Physical-Chemical Medicine, Department of Molecular Biology and Genetics, Moscow, Russia; ⁴Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia.

Humans vary in their ability to achieve success in strength sports. The aim of the study was to investigate the association between multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs), strength performance and elite strength athlete status in Russians. By using GWAS approach, we examined the association between 1,140,419 SNPs and competition results (sum of snatch and clean and jerk) adjusted for weight and sex in 57 international-level Russian weightlifters (35 males and 22 females). To validate obtained results, we further performed case-control studies by comparing the frequencies of the most significant SNPs between weightlifters and other elite strength athletes (n=137) and opposite cohorts (191 Russian controls and 147 Russian endurance athletes). We first identified 108 SNPs associated (P=10⁻⁵-10⁻⁶) with strength performance. Next, case-control studies resulted in remaining five SNPs (rs945453, rs17747560, rs7838961, rs4918599, rs7201586) associated with elite strength athlete status. The rs945453 SNP is located on the estrogen-related receptor gamma (ESRRG) gene (regulates muscle fibre composition, metabolism and angiogenesis). The rs17747560 SNP is located on the phosphomannomutase2 (PMM2) gene (encodes a protein that catalyzes the isomerization of mannose 6-phosphate to mannose 1-phosphate). The rs7838961 SNP is located on the bone morphogenetic protein 1 (BMP1) gene (encodes a protease involved in the activation of myostatin and other factors). The rs4918599 SNP is located on the RNA binding motif protein 20 (RBM20) gene (encodes a protein that binds RNA and regulates splicing of dozens of genes, including sarcomeric genes such as titin and others). The rs7201586 SNP is located on the 4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT) gene (encodes a protein that is responsible for catabolism of neurotransmitter gamma-aminobutyric acid into succinic semialdehyde).

S10-04

GENOME-WIDE ASSOCIATION ANALYSIS IDENTIFIES LOCI ON DMD AND UGT2B4 GENES FOR POWER ATHLETE STATUS IN RUSSIANS

Mustafina L.J.^{1,2}, Naumov V.A.³, Egorova E.S.², Galeeva A.A.¹, Kulemin N.A.^{3,4}, Generozov E.V.³, Khafizova G.N.¹, Khakimullina D.R.¹, Kostryukova E.S.³, Larin A.K.³, Bravy Y.R.⁵, Ospanova E.A.³, Pavlenko A.V.³, Martynanova D.S.¹, Kasimova R.R.¹, Almetova R.R.¹, Alexeev D.G.³, Govorun V.M.³, Ahmetov I.I.^{1,2,3}

¹*Volga Region State Academy of Physical Culture, Sport and Tourism, Sport Technology Research Centre, Kazan, Russia;* ²*Kazan State Medical University, Laboratory of Molecular Genetics, Kazan, Russia;* ³*Research Institute for Physical-Chemical Medicine, Department of Molecular Biology and Genetics, Moscow, Russia;* ⁴*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia;* ⁵*SSC RF Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Exercise Physiology, Moscow, Russia*

Athlete status is a heritable trait, with examples linking genetic variations for strength/power and endurance sports. Since strength/power and endurance are located at the opposite extremes of a muscle performance continuum, a genome-wide association study (GWAS) of 483 elite Russian strength/power and 200 endurance athletes was performed to identify common genetic variants associated with elite athlete status. Comparing genetic profiles of two groups of athletes, we identified 2 polymorphisms that reached genome-wide significance: rs17671289 in UDP-glucuronosyltransferase 2B4 (UGT2B4) and rs939787 in dystrophin (DMD) genes. UGT2B4 is involved in steroid metabolism, while DMD is an important structural component within muscle tissue that provides muscle contraction, linking the intracellular cytoskeleton to the extracellular matrix. Rare variants of UGT2B4 (21.7 vs. 7.4%; $P=6.6 \times 10^{-9}$) and DMD (25.0 vs 8.8%; $P=3.9 \times 10^{-9}$) genes were over-represented in strength/power athletes (compared to endurance athletes) and positively associated with strength performance (DMD; all elite weightlifters: $P=0.014$), muscle mass (DMD; females: $P=0.0186$) and level of several anabolic hormones (growth hormone (DMD; males: $P=0.0014$), testosterone (UGT2B4; females: $P=0.0069$) and insulin (UGT2B4; females: $P<0.0001$)) of athletes. Collectively, these results suggest that variations within UGT2B4 and DMD genes play an important role in the determination of success in strength and power sports.

S10-05**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РАЗВИТИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ**

Муженя Д.В., Тугуз А.Р., Дорошенко А.С., Руденко К.А., Смольков И.В., Шумилов Д.С.
ФГБОУ ВПО "АГУ", НИИ "Комплексных проблем", г. Майкоп, Россия

Поиск молекулярно-генетических маркеров адаптации кардиореспираторной системы спортсменов в условиях возрастающих физических нагрузок актуален для современной физиологии спорта.

Цель: идентифицировать полиморфизмы генов, ассоциированные с развитием функциональных возможностей спортсменов по данным МПК и PWC170.

Материалы и методы. Полиморфизмы генов ACE (Ins/Del, rs4646994), AGT (Met235Thr, rs699), AGTR1 (A1166C, rs5186), APOE (Leu28Pro, rs769452), MTHFR (Ala222Val, rs1801133) исследованы SNP-методом (НПФ «Литех», г. Москва) в образцах геномной ДНК 124 доноров и 40 квалифицированных спортсменов 18-25 лет Республики Адыгея: 20 футболистов, 10 баскетболистов и 10 легкоатлетов (бег на средние дистанции). Функциональные показатели кардиореспираторной системы оценивали по PWC170 (Вт, кгм/мин/кг) и максимальному потреблению кислорода (МПК, мл/мин/кг) («Нейрософт», г. Иваново). Статистический анализ проводили с использованием методов Спирмена, Фишера и χ^2 (хи-квадрата).

Результаты исследований. С развитием функциональных возможностей квалифицированных спортсменов РА достоверно ассоциированы полиморфизмы генов метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR (Ala222Val) и ангиотензин-превращающего фермента ACE (I/D). Маркером физической работоспособности баскетболистов является Ala222Val генотип MTHFR, коррелирующий с более высокими показателями PWC170 ($274,0 \pm 12,7$ Вт, $r = +0,78$; $p \leq 0,05$) в сравнении с носителями Ala222Ala генотипа ($245,2 \pm 7,1$ Вт). Установлен молекулярно-генетический маркер развития аэробных возможностей организма - DD генотип гена ACE. В группе квалифицированных спортсменов по сравнению с контрольной группой отмечено повышение частот DD генотипа и D аллеля (соответственно $\chi^2 = 12,19$; $p = 0,005$ и $\chi^2 = 11,75$; $p = 0,0006$), показателей аэробных возможностей организма по данным МПК ($58,9 \pm 4,47$ и $42,7 \pm 2,34$ мл/мин/кг). Положительная корреляция между DD генотипом ACE и показателями МПК ($r = +0,86$ при $p < 0,01$) выявлена также в контрольной группе. Полученные данные могут быть использованы при отборе и подготовке высококвалифицированных спортсменов.

S10-06

РОЛЬ G197/197A ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА IL-17A В ДОНОЗОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

**Муженя Д.В., Тугуз А.Р., Руденко К.А., Дорошенко А.С., Смольков И.В., Шумилов Д.С.
 ФГБОУ ВПО "АГУ", НИИ "Комплексных проблем", г. Майкоп, Россия**

Выявление наиболее ранних и информативных предикторов развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у квалифицированных спортсменов в условиях интенсификации физических нагрузок - актуальная задача современной спортивной медицины. Наряду с синтропными генами-кандидатами ССЗ: AGT, AGTRI, APOE, ACE, в последнее время уделяют внимание генам медиаторов иммунной системы - цитокинам и, в частности, гену основного провоспалительного цитокина IL-17A.

Цель: исследование полиморфизмов гена IL-17A, ассоциированных с системными воспалительными процессами; оценка риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у квалифицированных спортсменов Республики Адыгея.

Материалы и методы. G197/ 197A полиморфизмы гена IL-17A исследованы SNP-методом (НПФ «Литех», г. Москва) в образцах геномной ДНК 24 доноров, 17 квалифицированных спортсменов 18-25 лет и 42 больных 40-73 лет с гипертонической болезнью (ГБ), ишемической болезнью сердца (ИБС), инфарктом миокарда (ИМ) и др. ССЗ - осложнениями коронарного и периферического атеросклероза. Статистический анализ проводили с использованием методов Спирмена, Фишера и χ^2 (хи-квадрата) и расчета отношения шансов (OR).

Результаты исследований. У больных с ССЗ по сравнению с донорами выявлены достоверные более высокие частоты G197G генотипа (соответственно 0,633:0,273, $p=0,006$; $\chi^2=7,56$) и G197 аллели гена IL-17A (0,750:0,364, $p=0,001$; $\chi^2=10,51$). Риск развития ССЗ у носителей генотипа G197G увеличивается в 9,56 раза. В группе молодых квалифицированных спортсменов соотношение GG, GA, AA генотипов и G197/197A полиморфизмов гена IL-17A статистически значимо не отличалось от больных с тяжелыми формами ССЗ: ИБС, ИМ и др. (0,633:0,625 и 0,750:0,781). Высокая частота G197 аллеля гена IL-17A у профессиональных спортсменов является фактором риска развития ССЗ ($p<0,05$; OR=5,85) в более зрелом возрасте. Исследование частотного распределения G197/197A полиморфизмов гена ключевого провоспалительного IL-17A у квалифицированных спортсменов имеет важное значение в прогнозе и профилактике ССЗ.

S10-07

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ИГРОВЫМ ВИДАМ СПОРТА

Будко А.Н.¹, Гайдукевич И.В.², Гилеп А.А.², Гилеп И.Л.¹, Иванчикова Н.Н.¹, Нехвядович А.И.¹

¹НИИ физической культуры и спорта, Минск, Республика Беларусь, ²Институт биоорганической химии НАН, Минск, Республика Беларусь

Развитие физических качеств спортсмена зависит от состояния всех систем его организма: сердечно-сосудистой, опорно-двигательной, нейромедиаторных систем и др. Состояние этих систем во многом обусловлено генетическими факторами. На сегодняшний день насчитывается более 200 генов, полиморфизмы которых ассоциированы с проявлением тех или иных физических качеств, биохимическими, морфофункциональными и психическими особенностями. Этот факт делает возможным раннюю профилизацию спортсмена и организацию тренировочного процесса с учетом генетических особенностей каждого спортсмена. Командные виды спорта – это любой спорт, в котором игроки играют в команде для достижения общей цели. Помимо непосредственной физической нагрузки, работа в команде предполагает определенную психологическую нагрузку, которая характерна именно для игровых видов спорта, а именно, совместное решение стратегических задач, разрешение конфликтных ситуаций на игровой площадке, способность своевременно реагировать на быструю смену обстановки на игровом поле. Спортсменам игровых видов спорта свойственна максимальная скорость простой и сложной реакций, что значительно отличает их от представителей циклических, направленных на развитие в первую очередь выносливости, видов спорта.

Целью данного исследования было проанализировать распределение аллелей и генотипов по полиморфизмам ключевых генов, характеризующих состояние, сердечно-сосудистой, мышечной, метаболической и нейромедиаторных систем среди спортсменов. В исследовании приняли участие белорусские спортсмены различных квалификационных категорий. В зависимости от вида спорта были сформированы 2 группы: 1 гр. - виды спорта, требующие выносливости, 2 гр. - командные виды спорта.

Распределение аллелей и генотипов по полиморфизмам генов PPARG (g/c), PPARG (pro/ala), ACE (I/D), ACTN (R/X), BDKRB2 (+9/-9), eNOS3 (ab), HTR2A (T102C) между группами 1 и 2 различалось. Для полиморфизмов SLC6A4 (5HTTLPR), MAOA(30bpVNTR), HTR2A (A-1438G), eNOS3 (G894T) частота встречаемости аллелей и генотипов достоверно различалась между 1 и 2 группой. Эта картина наблюдается как в общей выборке, так и при разделении выборки на подгруппы по мастерству, что позволяет предположить существенную роль серотонинергической системы в реализации успешной спортивной деятельности.

Спонсоры и участники выставки

ООО «Агентство Химэксперт»

Адрес: 127006, Москва, ул. Краснопролетарская, дом 7, офис 2
тел./факс +7 (499) 973-92-80
E-mail: info@khimexpert.ru

www.khimexpert.ru



Являясь официальным дилером компаний AB SCIEX и LifeTechnologies, Агентство «Химэксперт» предоставляет современное оборудование, программное обеспечение и реагенты для решения следующих задач:

Масс-спектрометрический анализ:

контроль содержания вредных веществ в окружающей среде
контроль качества продуктов питания
биоаналитика
фармакологические исследования
допинг-контроль
протеомика

Молекулярно-биологический анализ:

генетический анализ
генотипирование
ПЦР в реальном времени
генетическая идентификация микроорганизмов
системы секвенирования нового поколения

ООО «Компания ЛабИнструментс»

Адрес: 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,
ИБХ РАН, корп. 22/32, офис 306
Тел. (499) 742-88-72
тел./факс (495)223-48-15
E-mail: info@labinstruments.ru



Сфера деятельности ООО «Компания ЛабИнструментс» – поставка лабораторного оборудования, аналитических приборов, расходных материалов для научных исследований и производства. Также компания осуществляет подбор общелабораторного и вспомогательного оборудования для комплексного оснащения лабораторий биологического, химического и биотехнологического профиля, а также термоаналитического оборудования.

Основные поставщики ООО «Компания ЛабИнструментс» – ведущие американские и европейские производители: LabconcoCorporation, NewBrunswickScientific, GuavaTechnologies, LinseisGmbH, HeinzWalzGmbH, Eppendorf AG. Это обеспечивает высокое качество поставляемой продукции и надежность предлагаемых технических решений.

ООО «Сигма-АлдричРус»

Адрес: 105062, г. Москва, ул. Макаренко, дом 2/21, стр.1, кв.22

Тел. 8-800-100-7425
тел./факс (495) 621 58 28
E-mail: ruorder@sial.com



<http://www.sigmaaldrich.com/russian-federation.html>

Корпорация Sigma-Aldrich - ведущий мировой производитель лабораторных химических реактивов для исследований в области естественных наук, высоких технологий и для промышленных производств.

ООО «Сигма – АлдричРус» - дочерняя компания в составе корпорации, представляет корпорацию в России и осуществляет оптовые и розничные поставки химических реактивов и лабораторного оборудования.

ООО МС Аналитика

Адрес: 119991 Россия Москва Косыгина, 19

Тел. (495)9358876
тел./факс (495)9358876
E-mail: ruorder@sial.com



www.lcms.ru

МС АНАЛИТИКА – эксклюзивный дистрибьютор оборудования для хроматографии и масс-спектрометрии ведущего производителя аналитических приборов ThermoFisherScientific. Корпорация ThermoFisherScientific разрабатывает и производит лучшие в мире аналитические приборы: от настольных газовых и жидкостных хроматографов и их комбинаций с масс-спектрометром до масс-спектрометров высокого и сверхвысокого разрешения для измерения с высочайшей точностью и чувствительностью изотопного, элементного и молекулярного состава веществ. Мы предлагаем вам оборудование для любого вида анализа – органического, элементного, изотопного, в любой области применения – науке, промышленности, экологии, медицине, криминалистике. МС АНАЛИТИКА занимается поставкой и обслуживанием хроматографических систем и масс-спектрометрических комплексов производства концерна уже более 25 лет. Высочайший уровень квалификации сотрудников позволяет не только запускать в эксплуатацию сложнейшие приборы, но и проводить обучение, давать методические рекомендации, помогать в текущем обслуживании приборов. На собственной учебной базе МС АНАЛИТИКА проводит обучение хроматографии и масс-спектрометрии с выдачей сертификата повышения квалификации.

Приволжский филиал ООО «ОПТЭК»

Адрес: 420107, РТ, Казань, Спартаковская ул., 2В,
офис 121-А

Тел. (843) 23 66 999
тел./факс 8 800 2000 567
E-mail: office-kazan@optecgroup.com



www.optecgroup.com

Компания ОПТЭК — разработчик и поставщик комплексных решений для науки, образования, инновационной индустрии, промышленности и здравоохранения. Продолжая и развивая деятельность, начатую компанией CarlZeiss, уже более 10 лет компания представляет в России, странах СНГ, Украине и Республике Грузия высокотехнологичное оборудование мировых лидеров в области технологий и инноваций.

Решения ОПТЭК включают в себя различное оптическое и электронно-оптическое оборудование: световые, лазерные сканирующие и электронные микроскопы; нанотехнологические системы; системы электронно- и ионнолучевой литографии; системы химического спектрального анализа; атомно-силовые микроскопы, рентгеновское аналитическое оборудование, приборы и программное обеспечение для патанатомических лабораторий. Все наши решения для партнеров индивидуальны и используют лучшие достижения современных технологий во всех областях нашей деятельности.

Творчество, взаимное уважение и партнерство внутри компании — это основной принцип нашей работы и гарантия успеха. Существенным вкладом в нашу уникальность является более чем 100-летняя история успешной деятельности CarlZeiss в России и странах СНГ, которую продолжает компания ОПТЭК.

MERCK MILLIPORE

Адрес: Россия, г. Москва
Тел. (495) 931-91-91
E-mail: mm.russia@merckgroup.com



www.merckmillipore@merckgroup.com/ru

"Как производитель и партнер в выполнении исследований, компания MerckMillipore причастна к развитию научных знаний и разработке новых терапевтических стратегий.

В рамках участия в конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" компанией MerckMillipore будет представлена информация о новом продукте - **SmartFlare** - зондах для детекции РНК в живых клетках – результат инновационных разработок в области исследований экспрессии генов.

Уникальность и преимущества данной технологии основано на работе с живыми клетками, обнаружении немодифицированной РНК, возможности дальнейших экспериментов на используемой культуре клеток. Эти разработки представляют собой проверенные решения для различных областей исследований и подкреплены компетентной технической поддержкой".

Bio-Rad Laboratories

Адрес: 117105, Москва, Варшавское шоссе, 9

Тел. +7 495 721 14 04
 тел./факс +7 495 721 14 12
www.bio-rad.com



"Bio-Rad Laboratories – международная компания, разработчик и производитель оборудования, расходных материалов и программного обеспечения в области научных исследований и клинической лабораторной диагностики. Основана в 1952 году в США.

Используя инновационные подходы, Bio-Rad Laboratories стремится постоянно совершенствовать производимые приборы и реагенты, а также активно разрабатывать и внедрять в жизнь современные технологии в области геномики и протеомики.

Каталог насчитывает более 8 000 наименований. В компании работают более 6 тыс. сотрудников по всему миру, в том числе, в России и СНГ.

Bio-Rad Laboratories занимает лидирующие позиции в производстве современного оборудования для молекулярно-биологических исследований:

- Амплификаторы и приборы для ПЦР «в реальном времени».
- Приборы для цифровой капельной ПЦР
- Оборудование для хроматографии, электрофореза и блоттинга.
- Системы для документирования и анализа изображений.
- Системы для трансфекций и переноса генов.
- Системы протеомного анализа.
- Приборы для определения межмолекулярных взаимодействий.
- Системы для сортировки клеток и имиджинга клеток

Наша миссия - предоставление качественных продуктов и услуг, способствующих достижению научных открытий и улучшению здравоохранения.

**СБОРНИК ТРУДОВ
IV МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ**

***Постгеномные методы анализа в биологии,
лабораторной и клинической медицине***

**КАЗАНЬ, РОССИЯ
29 октября – 1 ноября 2014**

Подписано в печать 30.10.2014.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Формат 60х84 1/16. Усл. печ. л. 17,3.
Уч.-изд. л. 14,3. Тираж 50 экз. Заказ 201/10.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нухина, 1/37
тел. (843) 233-73-59, 233-73-28